

Humboldt Universität zu Berlin

Dissertation

Ausprägung wichtiger Eigenschaften für die generative Vermehrung einer gartenbaulichen Modell-Kultur unter dem Einfluss von Genotyp und Umwelt

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum argriculturarum
(Dr. rer. agr.)**

**eingereicht an der
Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin**

von

Dipl.-Ing. agr. Ghofran Ghanem

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät:
Prof. Dr. Dr. h. c. Frank Ellmer

Gutachter:

1. Prof. Dr. Eckhard George
2. Prof. Dr. Frank H. Hellwig
3. Prof. Dr. Christof Engels

Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.2011

HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN



| | |
|---|---------------|
| 1 ALLGEMEINE EINLEITUNG | 9 |
| 1.1 Einflussfaktoren | 10 |
| 1.1.1 Genotyp..... | 10 |
| 1.1.2 Umweltfaktoren | 13 |
| 1.1.2.1 Mikroorganismen | 13 |
| 1.1.2.1.1 <i>Piriformospora indica</i> | 14 |
| 1.1.2.2 Düngung (Phosphor) | 15 |
| 1.2 Steckbrief der geprüften Modellkultur | 17 |
| 1.3 Forschungsziele | 18 |
| 2 ANALYSE GENERATIVER MERKMALE VON INTERSPEZIFISCHEN CYCLAMEN-HYBRIDEN | 22 |
| 2.1 Zusammenfassung | 22 |
| 2.2 Einleitung..... | 22 |
| 2.3 Material und Methoden..... | 24 |
| 2.3.1 Pflanzenmaterial | 24 |
| 2.3.2 Methoden | 25 |
| 2.3.2.1 Pollenvitalität | 25 |
| 2.3.2.2 Vitalität der Samenanlagen | 26 |
| 2.3.2.3 Mikrosporogenese | 26 |
| 2.3.2.4 Mikroskopische Analysen..... | 27 |
| 2.3.2.5 Statistische Analysen | 27 |
| 2.4 Ergebnisse | 27 |
| 2.4.1 Pollenvitalität | 27 |
| 2.4.2 Vitalität der Samenanlagen..... | 30 |
| 2.4.3 Mikrosporogenese..... | 32 |

| | |
|----------------------|----|
| 2.5 Diskussion | 36 |
|----------------------|----|

3 UNTERSUCHUNGEN ZUR BEFRUCHTUNG UND SAMENBILDUNG

| | |
|--|-----------|
| INTERSPEZIFISCHER CYCLAMEN-HYBRIDEN | 40 |
|--|-----------|

| | |
|--------------------------|----|
| 3.1 Zusammenfassung..... | 40 |
|--------------------------|----|

| | |
|----------------------|----|
| 3.2 Einleitung | 41 |
|----------------------|----|

| | |
|---------------------------------|----|
| 3.3 Material und Methoden | 43 |
|---------------------------------|----|

| | |
|-----------------------------|----|
| 3.3.1 Pflanzenmaterial..... | 43 |
|-----------------------------|----|

| | |
|---------------------|----|
| 3.3.2 Methoden..... | 43 |
|---------------------|----|

| | |
|---|----|
| 3.3.2.1 Pollenschlauchwachstum und Anzahl Samenanlagen..... | 43 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| 3.3.2.2 Flowcytometrische Messungen (Samenbildung) | 45 |
|--|----|

| | |
|-------------------------------------|----|
| 3.3.2.3 Statistische Verfahren..... | 45 |
|-------------------------------------|----|

| | |
|----------------------|----|
| 3.4 Ergebnisse | 46 |
|----------------------|----|

| | |
|--------------------------------|----|
| 3.4.1 Anzahl Samenanlagen..... | 46 |
|--------------------------------|----|

| | |
|------------------------------------|----|
| 3.4.2 Pollenschlauchwachstum | 47 |
|------------------------------------|----|

| | |
|-------------------------|----|
| 3.4.3 Samenbildung..... | 51 |
|-------------------------|----|

| | |
|----------------------|----|
| 3.5 Diskussion | 53 |
|----------------------|----|

| | |
|--|-----------|
| 4 WURZELBESIEDELUNG MIT <i>PIRIFORMOSPORA INDICA</i> FÖRDERT BEI OPTIMALEM PHOSPHORANGEBOT DIE MIKROSPOROGENESE SOWIE DIE POLLEN- UND SAMENANLAGENQUALITÄT BEI CYCLAMEN PERSICUM..... | 58 |
| 4.1 Zusammenfassung | 58 |
| 4.2 Einleitung..... | 59 |
| 4.3 Material und Methoden..... | 60 |
| 4.3.1 Pflanzenmaterial und Düngung..... | 60 |
| 4.3.1.1 Prüfvarianten..... | 62 |
| 4.3.2 Methoden | 62 |
| 4.3.2.1 Inokulation mit dem Pilz <i>Piriformospora indica</i> und Nachweis der Wurzelbesiedelung..... | 62 |
| 4.3.2.2 Pollenbildung | 63 |
| 4.3.2.3 Pollenvitalität | 64 |
| 4.3.2.4 Vitalität der Samenanlagen | 64 |
| 4.3.2.5 Mikroskopische Analysen..... | 64 |
| 4.3.2.6 Phosphatuntersuchung | 65 |
| 4.3.2.7 Statistische Verfahren | 65 |
| 4.4 Ergebnisse | 65 |
| 4.4.1 Einfluss des P-Angebotes und der Piri-Besiedlung | 65 |
| 4.4.2 Intensität der Piri-Besiedlung der Cyclamenwurzeln | 66 |
| 4.4.3 Einfluss von Phosphorstatus und Piri-Inokulation auf die Mikrosporogenese..... | 66 |
| 4.4.4 Wechselwirkung von P-Angebot und Piri-Inokulation auf die Pollenvitalität | 68 |
| 4.4.5 Einfluss von P-Angebot und Piri auf die Lebensfähigkeit der Samenanlagen | 70 |
| 4.5 Diskussion..... | 72 |

| | |
|---|-----------|
| 5 EINFLUSS VON <i>PIRIFORMOSPORA INDICA</i> UND PHOSPHOR-ANGEBOT AUF BEFRUCHTUNG UND SAMENBILDUNG BEI <i>CYCLAMEN</i>..... | 76 |
| 5.1 Zusammenfassung..... | 76 |
| 5.2 Einleitung | 77 |
| 5.3 Material und Methoden | 78 |
| 5.3.1 Pflanzenmaterial und Düngung..... | 78 |
| 5.3.1.1 Prüfvarianten | 80 |
| 5.3.2 Methoden..... | 80 |
| 5.3.2.1 Vegetative Entwicklungen..... | 80 |
| 5.3.2.1.1 Blühzeitpunkt/Verkaufsreife und Blütenanzahl..... | 80 |
| 5.3.2.1.2 Pflanzendurchmesser | 80 |
| 5.3.2.2 Inokulation mit dem Piri-Pilz (<i>Piriformospora indica</i>) und Nachweis der Wurzelbesiedelung | 81 |
| 5.3.2.3 Bestäubungsgruppen | 82 |
| 5.3.2.4 Befruchtungsvorgang | 82 |
| 5.3.2.5 Flowcytometrische Messungen (Samenbildung) | 82 |
| 5.3.2.6 Phosphorkonzentration in den Pflanzen | 83 |
| 5.3.2.7 Statistische Verfahren..... | 83 |
| 5.4 Ergebnisse | 84 |
| 5.4.1 Vegetative Entwicklungen | 84 |
| 5.4.1.1 Blühzeitpunkt/Verkaufsreife und Blütenanzahl | 84 |
| 5.4.1.2 Pflanzendurchmesser..... | 84 |
| 5.4.2 Besiedelungsgrad mit <i>Piriformospora indica</i> | 85 |
| 5.4.3 Befruchtungsvorgang | 85 |
| 5.4.4 Samenbildung..... | 87 |
| 5.4.5 Samenanzahl..... | 90 |

| | |
|---|------------|
| 5.4.6 Phosphorkonzentration der Samenträger | 92 |
| 5.4.6.1 Einfluss von Phosphorangebot, Sprossorgan und Entwicklungsstadium | 92 |
| 5.4.6.2 Einfluss von Phosphorangebot und Piri-Inokulation | 94 |
| 5.5 Diskussion..... | 94 |
| 6 ALLGEMEINE DISKUSSION | 97 |
| 6.1 Einfluss des Genotyps auf generative Merkmale | 97 |
| 6.2 Einfluss des Ploidiegrades auf generative Pflanzeigenschaften..... | 99 |
| 6.3 Einfluss von <i>Piriformospora indica</i> auf vegetative und generative Pflanzeigen- schaften sowie die Phosphoraufnahme | 100 |
| 6.4 Einfluss von Phosphor auf vegetative und generative Pflanzeigenschaften | 101 |
| 7 ZUSAMMENFASSUNG..... | 103 |
| 8 SUMMARY | 107 |
| 9 LITERATURVERZEICHNIS | 111 |
| DANKSAGUNG | 125 |

1 Allgemeine Einleitung

Das Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau (IGZ) mit Standorten in Großbeeren und Erfurt erarbeitet wissenschaftliche Grundlagen für eine ökologisch sinnvolle und wirtschaftliche Erzeugung von Gartenbaukulturen. Ziel des Forschungsprogramms des IGZ ist es, Fortschritte im genetischen oder ökologischen Verständnis von Lebensprozessen auf moderne Gartenbausysteme anzuwenden. So wird am IGZ Wachstum, Entwicklung und Qualität von Pflanzen unter optimalen und unter ungünstigen Bedingungen untersucht und der Einfluss sich wandelnder Umweltbedingungen auf die gärtnerische Produktion bewertet (Jahresbericht des IGZ, 2007/2008).

Im konventionellen Gartenbau wird eine umweltschonende Kultivierung angestrebt. Im Vordergrund der Züchtung gärtnerischer Kulturen stehen dabei die Pflanzengesundheit (Resistenzzüchtung) zur weiteren Minimierung des Pflanzenschutzmittelbedarfs, aber auch die Erhöhung der Qualitätseigenschaften der Kulturpflanzen für den Verbraucher und den Produzenten.

So müssen alle verfügbaren biologischen Potentiale ausgeschöpft werden, um gängige Produktionsbedingungen nachhaltig und umweltschonend zu gestalten. Es müssen dazu alle Kulturmaßnahmen angewandt werden, die bei geringerem Energieeinsatz zu optimalen Wachstumserfolgen der Kulturpflanzen im Gartenbau führen. Zu diesen Gebieten zählt auch die Pflanzenernährung im Gartenbau. Zum größten Teil sind die Probleme von Ernteaussfällen in Bezug auf die Nährstoffversorgung gelöst worden. So haben Menschen gelernt, wie man den Ertrag der Pflanzen durch Züchtung und Düngung erhöht.

In Zukunft muss in der gartenbaulichen Praxis versucht werden, mit reduzierten Mengen an Pflanzenschutzmitteln und Mineraldünger auszukommen. In diesem Kontext wird zunehmend auch die Wirkungsweise von Mikroorganismen untersucht. Mikroorganismen können die Gesundheit von Pflanzen stärken, Wachstum und Qualität verbessern oder als Pathogene direkte und indirekte Schäden an den Pflanzen verursachen. Forschungsgegenstand sind die biologischen Grundlagen der Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und Pathogenen und ihrer Beeinflussbarkeit durch andere Organismen (Endophyten).

Die Kombination einzelner Maßnahmen soll einen Beitrag zur Entwicklung eines Pathogen- managements in ökologisch stabilen Produktionssystemen leisten.

Eine der am IGZ am intensivsten in der anwendungs- und grundlagenorientierten Forschung bearbeiteten Kulturen sind Cyclamen (Alpenveilchen). Ziel dieser Forschungen ist es, wissenschaftliche Grundlagen für die generative und vegetative Reproduktion von Kulturformen, Wildarten und interspezifische Hybriden zu erarbeiten. Unter Einbeziehung molekularer Markertechniken werden u. a. umfangreiche Untersuchungen zur Vermehrung von Cyclamen über somatische Embryogenese vorgenommen. Die gewonnenen Kenntnisse werden der gärtnerischen Praxis als Richtlinien zur Optimierung und Stabilisierung von Vermehrungssystemen zur Verfügung gestellt. Aufgrund der breitgefächerten Forschungen und ihrer großen wirtschaftlichen Bedeutung können Cyclamen deshalb im Bereich des Gartenbaus als eine Modellkultur angesehen werden.

Genetische Faktoren und Umweltfaktoren bestimmen gemeinsam die Merkmalsausprägung. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit neben genetischen Faktoren auch der Einfluss von Umweltfaktoren wie Düngung und Mikroorganismen auf vegetative und generative Merkmale (Pollen- und Samenanlagenqualität, Pollenschlauchwachstum, Samenbildung und -ertrag) geprüft.

In den folgenden Abschnitten werden kurze Einführungen in die verschiedenen Forschungs-Bereiche dieser Arbeit gegeben.

1.1 Einflussfaktoren

Die Entwicklung der Pflanzen hängt von vielen Faktoren ab, die miteinander in Wechselwirkung stehen.

1.1.1 Genotyp

Die Menschheit beschäftigt sich schon seit langem, wie z. B. der griechische Philosoph Anaxagoras 500 Jahre vor Christus, mit der Vererbungslehre und den Grundlagen der Genetik, um zu erklären, wie Merkmale von einer Generation auf die andere übertragen werden. Inzwischen wurden mehrere Vorstellungen und Hypothesen über die

Regelmäßigkeit sowie Spontanität des Auftretens einiger Merkmale beim Menschen, bei Tieren und bei Pflanzen entwickelt (vgl. Stubbe 1965).

Der amerikanische Biologe Sutton stellte im Jahr 1903 die Theorie auf, dass die Chromosomen die Träger der Erbinformation sind. Thomas Morgan konnte später die Gene als Erbanlagen auf den Chromosomen der Taufliegen genau lokalisieren. Schließlich wurde von Watson und Crick (1953) die doppelte Helixstruktur der DNA entdeckt.

Die Vererbung von Merkmalen, die nur von einem Gen bestimmt werden, wurde erstmals von Gregor Mendel (1822 - 1884) formuliert. Seine Forschungen führte er größtenteils an der Gartenerbse (*Pisum sativum*) und der japanischen Wunderblume (*Mirabilis jalapa*) durch. Mendel zeigte in seinen Kreuzungsexperimenten an Erbsen (*Pisum sativum*), dass es neben dem Erscheinungsbild äußerlich nicht sichtbare, in einer regelhaften Art und Weise vererbte Faktoren gibt, die er „Erbfaktoren“ nannte und die die jeweilige Ausprägung des Phänotyps mit verursachen. So konnte er anhand der statistischen Ergebnisse seine Regeln formulieren.

Diese Regeln haben bis heute noch größtenteils Gültigkeit, auch wenn inzwischen viele neue Erkenntnisse dazu gekommen sind und die Allgemeingültigkeit der Regeln eingeschränkt haben. Daher werden die früher als Mendelsche Gesetze (1. und 2. Mendelsches Gesetz) bezeichneten Sätze inzwischen „nur“ noch als Regeln bezeichnet (Böhme et al., 1976).

So wird mit Vererbung die Weitergabe von genetischer Erbinformation an die nachfolgenden Generationen einer Art bezeichnet.

Weitergegeben werden nur genetisch festgelegte Eigenschaften (Genotyp). Erlernete Verhaltensweisen und alle morphologischen und physiologischen Merkmale (Phänotyp) gehören nicht dazu. Der Phänotyp beeinflusst damit das Erscheinungsbild und wird definiert vom Genotyp, indem die auf den Genen enthaltenen Informationen abgelesen und umgesetzt (exprimiert) werden (www.philosophy-online.de/pdf/genophaeno.pdf). Darüber hinaus hatte Wilhelm Johannsen (1909) die Begriffe „Genotyp“ und „Phänotyp“ untersucht, um damit eine Unterscheidung begrifflich scharf zu verstehen, die Gregor Mendel (1866) in der Analyse seiner Kreuzungsexperimente bereits implizit getroffen hatte (Lewontin, 1992, 2008).

Während der Entwicklung eines Organismus nehmen auch die Umweltbedingungen wie Klima, Boden oder Höhenlage Einfluss auf den Wuchs von Pflanzen und auch deren Ertragsfähigkeit. Diese Einflüsse prägen den Phänotyp ebenfalls und werden als

Modifikation bezeichnet. Sie sind im Gegensatz zum Genotyp nicht vererbbar, sondern eine direkte Reaktion auf Umweltreize, so dass das unterschiedliche Verhalten von Sorten mit großer Wahrscheinlichkeit auf den unterschiedlichen genetischen Ursprung der Sorten und die damit verbundenen Standortanpassungen der Elternlinien zurück geht. Aus diesen Beobachtungen der Reaktionen von Pflanzen mit der Umgebung wurden Anbausysteme entwickelt.

Die Züchtungsforschung hat sich inzwischen neben Ertragssicherheit, Krankheitsresistenz und Stresstoleranz auch auf die Produktqualität bzw. den Gehalt und die Zusammensetzung von spezifischen, pflanzlichen Inhaltstoffen konzentriert. Aus der Vielfalt der zur Verfügung stehenden Genotypen wurden durch strenge Selektion erwünschte Eigenschaften in einzelnen Sorten kombiniert. Eine weitere Erhöhung der Leistungsfähigkeit moderner Kultursorten wird allerdings zunehmend schwieriger. Um bei züchterisch intensiv bearbeiteten Merkmalen, aber auch um in bisher weniger beachteten Bereichen, wie beispielsweise der Adaptionsfähigkeit an geänderte Umweltbedingungen, züchterische Erfolge zu erzielen, wäre eine Verbreiterung der genetischen Basis und dadurch eine Erhöhung der Variabilität wünschenswert. Darüber hinaus müssen Strategien entwickelt werden, um den Einsatz genetisch wenig adaptierten Materials sowie eine sinnvolle Auswahl geeigneter Kreuzungseltern mit möglichst geringem Aufwand für den Züchter zu ermöglichen.

Eine Methode zur Erweiterung der genetischen Basis sind Art- und Gattungskreuzungen. Allerdings spielen hier evolutionäre Kreuzungsbarrieren eine große Rolle. Zur Überwindung von pro- und/oder postzygotischen Kreuzungsbarrieren müssen häufig erst Methoden entwickelt werden. Die generative Reproduktion ist größtenteils abhängig von der Interaktion zwischen der Pflanze und ihrem Pollenvektor. Die Bedeutung dieser Interaktion spiegelt sich in der enormen Diversität von Merkmalen und Funktionen wieder, welche an Bestäubungs- und Befruchtungsprozessen beteiligt sind.

1.1.2 Umweltfaktoren

Eine Vielzahl von Umweltfaktoren, unter anderem Mikroorganismen, Ernährung der Pflanzen, Licht und Temperatur haben in Kombination mit genetischen Faktoren Auswirkungen auf die Eigenschaften und die Entwicklung der Pflanzen. Die Umweltfaktoren sind in den meisten Fällen deutlich stärker als die genetische Varianz, d. h. die quantitative Ausprägung von Qualitätseigenschaften ist im Allgemeinen starken Umwelteinflüssen unterlegen.

1.1.2.1 Mikroorganismen

Die Qualität der Pflanze kann durch Interaktionen mit Mikroorganismen beeinflusst werden.

In der Natur sind die Pflanzen einer Mikroorganismen-Besiedelung ausgesetzt. Diese Besiedelung kann sowohl mutualistischer Natur, also zum Nutzen beider Partner, als auch parasitärer Natur sein. Diese Interaktionen können sich positiv sowohl auf die Pflanzenernährung und die Entwicklung als auch auf ihre Resistenz bzw. Toleranz gegenüber biotischen und abiotischen Einflüssen auswirken (Azcón-Aguilar und Barea, 1996; Lekberg und Koide, 2005). Von den Mikroorganismen, die viele Vorteile für die Pflanzen haben, sind insbesondere Pilze von Bedeutung. Interaktionen von in der Pflanzenwurzel lebenden Pilzen und den Wirten haben große Bedeutung bei der Produktion von gartenbaulich und landwirtschaftlich genutzten Kulturen, da zusätzlich zur Nährstoffversorgung auch weitere positive Beiträge zum Pflanzenwachstum durch den Pilz verzeichnet werden können. Die Interaktion zwischen Pilz und Wirtspflanze kann je nach Art des Wirtes unterschiedlich ausfallen. Häufig als pathogen beschriebene Pilzarten (Candau et al., 1991) können in anderen Wirtsarten auch als kommensale oder mutualistische Endophyten vorkommen. Ektomykorrhiza-Pilze (Scagel und Linderman, 1998) und arbuskulärer Mykorrhizapilze (AM)

(Barea und Azcón-Aguilar, 1982) verbessern nicht nur die Entwicklung der Pflanzen, sondern auch ihre Ernährungsweise bei bidirektionalem Transfer der Nährstoffe und auch ihren Schutz gegen Pathogene. Zu diesen gutartigen Pilzen gehört auch der Pilz *Piriformospora indica*.

1.1.2.1.1 *Piriformospora indica*

Piriformospora indica (Sebacinales) ist ein endophytischer Pilz der zur Förderung des Pflanzenwachstums beitragen kann. Er wurde 1997 zufällig bei einer Analyse von Bodenproben aus der Thar Wüste (Rajasthan, Indien) von einer Spore eines arbuskulären Mykorrhizapilzes isoliert (Verma et al., 1998).

Aufgrund der charakteristischen birnenförmigen Chlamydosporen bekam er seinen Namen. Durch rDNA-Sequenzierungen wurde er der Formgattung *Rhizoctonia* aus der Gruppe der Hymenomyceten (*Basidiomycota*) (Verma et al., 1998) zugeordnet. Die dickwandigen asexuellen Vermehrungsorgane (Hallmann et al., 2007) enthalten 8-25 Nuklei (Zellkerne) und haben eine Breite von ca. 10 bis 17 µm und eine Länge von ca. 16 bis 25 µm (Verma et al., 1998). Vor kurzem wurde er einer neu definierten Ordnung, den *Sebacinales*, zugeordnet (Weiss et al., 2004). Die *Sebacinales* beinhalten eine Vielzahl von Endo- und Ektomykorrhizapilzen, die wie bei Orchideen und *Ericaceae* mit vielen weiteren mono- und dikotylen Pflanzen Symbiosen eingehen können (Weiss et al., 2004).

Dazu gehören Kräuter und Bäume, sowie verschiedene medizinisch interessante Pflanzen ökonomisch wichtige Getreidearten und weitere bedeutende Nutzpflanzen wie Tabak, Mais, Gerste, Reis und Hülsenfrüchte, aber auch Baumarten wie die Pappel (Singh et al., 2000; Rai et al., 2001; Pham et al., 2004; Kaldorf et al., 2005).

Der Pilz breitet sich durch inter- und intrazelluläres Hyphenwachstum in der Wurzel aus, und ist in der Epidermis sowie weiter innen liegend im Kortex der pflanzlichen Wurzel zu finden.

Weiterhin werden Dauersporen (Chlamydosporen) innerhalb des Wurzelgewebes und in der Rhizosphäre gebildet. Der Hyphendurchmesser von 0,7- 3,5 µm entspricht etwa einem Fünftel des Querschnitts von AM-Hyphen (Verma et al., 1998).

Wegen seiner Fähigkeit die Phosphor- und Wasseraufnahme zu verbessern, hatte *Piriformospora indica* deutliche positive Auswirkung auf verschiedene Wirtspflanzen.

So führte der Einsatz von *P. indica* zur Verbesserung des Wachstums verschiedener Pflanzenarten (Varma et al., 1999; Weiß et al., 2004). *P. indica* erhöhte die Frischmasse der Wurzel, die Wurzelverzweigung, die Wurzellänge und die Biomasse (Kaldorf et al., 2005; Shahollari, 2005; Varma et al., 1999; Waller et al., 2005; Kumar et al., 2009).

Zudem verkürzte er die Zeit bis zum Blühbeginn und erhöhte die Blütenanzahl und die Samenzahlen (Rai et al., 2001; Barazani et al., 2005; Shahollari et al., 2007). Neben den bereits genannten Effekten zeigten sich auch positive Auswirkungen auf pflanzliche

Eigenschaften bei biotischem und abiotischem Stress. An verschiedenen Getreidearten konnte ein deutlich verminderter Befall der Wurzelpathogene *Fusarium culmorum*, *F. gramineum*, *Cochliobolus sativus* oder *Rhizoctonia solani* beobachtet werden.

Weiterhin führte er zu erhöhter Toleranz gegenüber leichtem Salzstress und zu stärkerer Resistenz gegenüber Wurzel- und Blattpathogenen (Waller et al., 2005; Serfling et al., 2007; Deshmukh et al., 2006; Deshmukh und Kogel 2007; Sherameti et al., 2008; Baltruschat et al., 2008; Stein et al., 2008; Schäfer et al., 2009).

Die Mechanismen hinter den positiven Effekten von *P. indica* beruhen vermutlich auf seinem Einfluss auf das Gleichgewicht der Phytohormone der Pflanzen. *P. indica* produziert Auxin (IAA – Indol-3-Essigsäure), das das Wurzelwachstum bei *A. thaliana* beeinflusste, oder zumindest zur positiven Wirkung von *P. indica* auf die Wirtspflanzen beiträgt (Sirrenberg et al., 2007). Zudem zeigten andere Studien, dass die Hemmung der Ethylen-Signalübermittlung oder der Cytokinin-Produktion in den Wurzeln eine wichtige Rolle spielen (Barazani et al., 2007; Vadassery et al., 2008).

Für Zierpflanzen liegen bisher kaum Kenntnisse zur Wirkung des Pilzes vor. Drüge et al. (2007) konnten durch Einsatz des Pilzes teilweise eine erhebliche Verbesserung der Stecklingsbewurzelung nachweisen.

Wegen der vielfach beschriebenen positiven Wirkungen wurde *Piriformospora indica* in unserem Experiment gewählt, um bei Cyclamen-Samenträgern den Einfluss auf vegetative und generative Merkmale zu prüfen. Erste Untersuchungen am IGZ zeigten bei Cyclamen nach der Inokulation mit dem Pilz eine Blühverfrühung und eine höhere Blütenanzahl (unveröffentlicht).

1.1.2.2 Düngung (Phosphor)

Bei den Umwelteinflüssen spielt neben der Wasserversorgung, der Temperatur und dem Licht die Nährstoffversorgung eine wichtige Rolle für die Ausprägung vegetativer und generativer Pflanzenmerkmale. Die Lehre von der Pflanzenernährung behandelt als Zweig der Naturwissenschaften den Stoff- und Energieaustausch der Pflanzen mit der Umwelt.

Bei Pflanzenarten, deren Früchte, Samen bzw. Knollen im pflanzenbaulichen Focus der Ertragsbildung stehen, lassen sich die Auswirkungen der mineralischen Nährstoffversorgung auf den Ertrag in Dosis-Wirkungskurven abbilden. Dabei limitieren Einschränkungen, entweder durch einen Mangel oder eine übermäßige Zufuhr von

Mineralstoffen in bestimmten kritischen Perioden die Entwicklung der Pflanzen, einschließlich der Blühinduktion, Bestäubung und Initiation von Knollen (Marschner, 1995).

Neben Stickstoff und Kalium spielt Phosphor eine große Rolle. Zudem sind die meisten Nährelemente an zahlreichen Reaktionen des Stoffwechsels beteiligt. Ganz besonders deutlich wird dies bei Phosphor, Kalium und Magnesium, die für die Bereitstellung chemischer Energie in Form von Nucleotidphosphaten (ATP u.a.) und für die Nucleinsäurebildung erforderlich sind (Schilling, 2000).

Phosphor kommt im Boden in anorganischen oder organischen Bindungsformen vor. Phosphor wird aus der Bodenlösung als Phosphat aufgenommen. In Zeiten des intensiven Wachstums von Kulturpflanzen können bis zu 2,5 kg P_2O_5 je Hektar und Tag aufgenommen werden (Johnston und Steen, 2000). Im ökologischen Gartenbau ist als Form der Phosphor-Düngung die Zugabe von organischem Material, z.B. Hühnermist, und von Rohphosphat (European Union, 2004) erlaubt. Der Transport des Phosphates quer durch die Wurzel erfolgt nach Überführung in Nucleosid- und Zuckerphosphate zunächst in der letztgenannten Form.

Auf dem Weg zum Gefäßsystem entsteht jedoch wieder Orthophosphat, welches dann zum Ferntransport dient (Loughman, 1981). Phosphor (P) ist ein wesentlicher Makronährstoff bei vielen physiologischen und biochemischen Prozessen. So wirkt sich Phosphormangel nicht nur auf Pflanzenwachstum, Entwicklung und Ertrag, sondern auch auf die Qualität der Früchte und auf die Samenbildung aus. Eine verzögerte Reifung der Kulturen kann zur Qualitätsminderung der Produkte führen (Johnston und Steen, 2000).

Zudem hat Phosphor wesentlichen Einfluss auf die Größe der Pollenkörner und die Blüten- und Samenproduktion (Lau and Stephenson (1994) sowie auf die Samenanzahl, die Pollenanzahl pro Blüte und die Pollenqualität (Poulton et al. 2001,a, b, 2002).

1.2 Steckbrief der geprüften Modellkultur

Die Gattung *Cyclamen* L. gehört zur Familie der Myrsinaceae und umfasst ca. 20 Arten. Compton et al. (2004) beschreiben 21 Arten, Grey-Wilson (2002) führt 22 Arten auf. *Cyclamen* L. ist endemisch hauptsächlich im Mittelmeergebiet beheimatet. Das Vorkommen erstreckt sich nördlich bis in den Alpenraum und östlich bis hin zum Kaukasus (Gründler, 1987). Sie ist für den Systematiker und Evolutionsforscher interessant, weil sie eine ausgeprägte Karyotypevolution zeigt, die sich in der Variation der Basiszahlen einerseits und in Polyploidisierungen andererseits zeigt. Die Erklärung für diese Variationen der Basiszahl schließt Hybridisierungsvorgänge mit ein, die zusammen mit Polyploidisierungen für die Evolution vieler Pflanzengruppen ausgesprochen wichtig sind.

Alle gegenwärtig existierenden Sorten stammen von nur einer Art, von *C. persicum*, ab. Während die Wildform von *C. persicum* mit $2n = 2x = 48$ Chromosomen diploid ist, weisen die Zuchtformen neben diploiden auch triploide ($2n = 3x = 72$), tetraploide ($2n = 4x = 96$) oder aneuploide ($2n = 90, 92, 94$ und 95) Chromosomenzahlen auf. Tetraploide Pflanzen sind auf spontane Chromosomenzahlverdopplungen zurückzuführen. Triploide entstanden durch Kombination diploider mit tetraploiden Kulturformen (Legro, 1959).

Kommerzielle Bedeutung als Zierpflanze haben nur Kulturformen von *C. persicum* MILL. Die Züchtung konzentriert sich bei *C. persicum* auf die Nutzung der intraspezifischen Variation und auf Sortenkombinationen (Legro, 1959; Grey-Wilson, 1988). *Cyclamen* sind beliebte Topfpflanzen. Neben der zunehmenden Außenverwendung profitierten Alpenveilchen auch von einer gestiegenen Nachfrage als Geschenk. 2007 wurden bereits mehr als 21% der produzierten Alpenveilchen im Außenbereich (Gärten, Parks u.a.) gepflanzt. Nach Berechnungen der ZMP wurden im Jahr 2007 in Deutschland schätzungsweise 36 Millionen Alpenveilchen verkauft (Hanke, 2008).

Die Produktion wurde von der ZMP im gleichen Zeitraum auf rund 29 Millionen Pflanzen geschätzt. Das Umsatzvolumen mit Alpenveilchen lag 2007 in Deutschland im Einzelhandel nach einer Schätzung der ZMP bei etwa 100 Millionen Euro (Hanke, 2008). Auf Grund des gemeinsamen Ursprungs verfügen alle *Cyclamen*-Sorten über ein ähnliches genetisches Potential. So sind z. B. alle Sorten nicht winterhart und hochanfällig gegenüber dem Erreger der Welkekrankheit dem Pilz *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*. Kulturformen von *C. persicum* sind hinsichtlich ihrer Blüheigenschaften sehr attraktiv, das züchterische Potential ist jedoch weitestgehend ausgeschöpft. Neben *C.*

persicum gibt es andere Arten in der Gattung *Cyclamen* L., die wichtige Eigenschaften wie attraktive Blattzeichnung, Winterhärte, Duft oder Krankheitsresistenz besitzen (Ewald 1996, 2000; Grey-Wilson, 2002).

Die Vermehrung erfolgt durch Samen. Eine Kombination bestimmter Merkmale bzw. die Einlagerung neuer Eigenschaften durch Einkreuzung anderer Arten in das bestehende *Cyclamen*-Sortiment kann zu einer erheblichen Verbesserung der Werteigenschaften führen (Ishizaka, H; 1996 und Ewald et al. (2000). Interspezifische Kombinationen sind nach bisherigen Erkenntnissen aufgrund der hohen Kreuzungs-Inkompatibilität zwischen *C. persicum* und anderen Arten der Gattung nur mit Hilfe des Embryo rescue möglich (Ishizaka und Uematsu, 1990, 1992; Kobayashi und Ogawa, 1994; Ishizaka und Uematsu, 1995a; Ewald, 1996; Ishizaka, 1996).

Interspezifische Hybriden sind in der Pflanzenzüchtung eine wichtige Quelle zur Erweiterung der genetischen Basis.

1.3 Forschungsziele

Die Kenntnis generativer Eigenschaften interspezifischer Hybriden ist eine Voraussetzung für ihre weitere züchterische Bearbeitung und die Einführung in die gärtnerische Praxis.

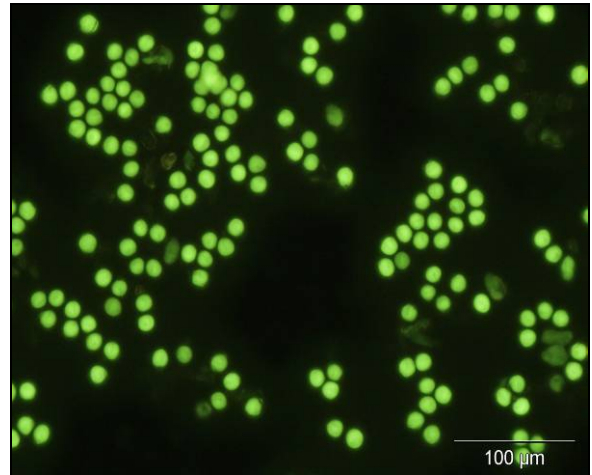
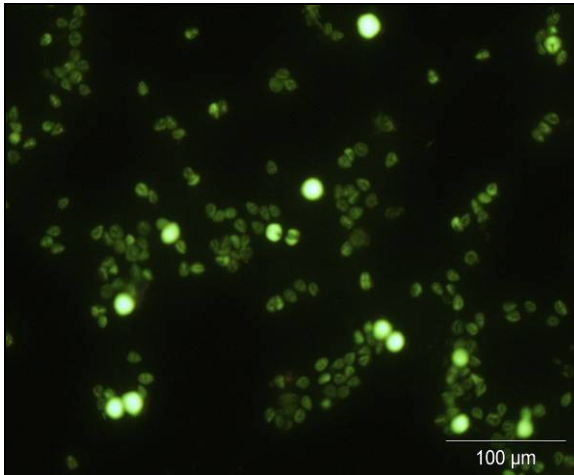
Diese Arbeit hat das Ziel, grundlegende Erkenntnisse zur Befruchtung und Samenbildung, als Grundvoraussetzungen für die Samenbildung, bei interpezifischen *Cyclamen*-Hybriden zu gewinnen. Dabei steht die Gewinnung grundlegender genotypischer Kenntnisse im Vordergrund. Einen breiten Raum nimmt die Ursachenfindung für Störungen in der Samenbildung ein. Desweiteren wird der Einfluss verschiedener Umweltfaktoren auf die generative und vegetative Merkmalsausprägung von *C. persicum* cv. geprüft.

So konzentrieren sich diese Forschungen:

1- auf vergleichende Untersuchungen zwischen Arthybriden mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund, die Analyse der Vitalität des Pollens und der Samenanlagen von interspezifischen *Cyclamen*-Hybriden und deren Kreuzungseltern. Dabei wird nach den Ursachen für Unterschiede in der Pollenvitalität gesucht. Analog der Ergebnisse aus der Literatur waren für die eigenen Hybriden Störungen bei der Pollenbildung sowie der Pollen- und Samenanlagenqualität zu vermuten.

- 2- auf den Gewinn von Kenntnissen zur Befruchtung und der Gewebedifferenzierung in Samenanlagen interspezifischer Cyclamen-Hybriden, als eine der Grundvoraussetzungen für die Samenbildung im Vergleich der Hybriden untereinander und der Kreuzungseltern. .
- 3- auf die Eignung der Hybriden für weitere Kreuzungsschritte (z . B. Rückkreuzbarkeit) für die züchterische Weiterbearbeitung.
- 4- auf die unterschiedlichen, physiologischen Wirkungen von *Piriformospora indica*, die den Auswirkungen arbuskulärer Mykorrhizapilze ähnlich sind. Hierbei wurde vermutet, dass eine Inokulation der Wurzeln mit dem Endophyten (*Piriformospora indica*) wichtige befruchtungsbiologische Parameter wie Vitalität der Pollen und Samenanlagen und die Mikrosporogenese beeinflussen kann. Diese Hypothese wird am Beispiel von *Cyclamen persicum* cv. in Kombination mit einem differenzierten Phosphor-Angebot als Kultivierungsfaktor geprüft.
- 5- auf die Ausprägung generativer Merkmale (Samenbildung, Samenanzahl) bei *Cyclamen persicum* cv., mit der Vermutung, dass diese durch eine Besiedelung der Gonophoren-Wurzeln (Samenträger) mit dem Endophyten *Piriformospora indica* in Verbindung mit einer differenzierten Phosphor-Ernährung positiv beeinflusst werden.
- 6- auf den speziellen Einfluss des Phosphor-Angebotes auf die vegetative (Entwicklung bis zur Blüte) und generative Merkmale von *Cyclamen persicum* cv. sowie auf die Auswirkungen des Phosphor-Angebots auf den Besiedelungsgrad der Gonophoren-Wurzeln mit *Piriformospora indica*.

Kapitel 2



Vitalität der Pollenproben

2 Analyse generativer Merkmale von interspezifischen Cyclamen-Hybriden

2.1 Zusammenfassung

Die Analyse generativer Merkmale interspezifischer Hybriden ist von Bedeutung für die Einbeziehung in Züchtungsprogramme und die Vermehrung. Von Hybriden zwischen *C. persicum* ($2n = 2x = 48$) x *C. purpurascens* ($2n = 2x = 34$) und *C. persicum* ($2n = 2x = 48$) x *C. hederifolium* ($2n = 2x = 34$) wurden Vitalität von Pollen und Samenanlagen untersucht sowie Ursachen für Unterschiede in der Pollenvitalität analysiert.

Vitalität der Samenanlagen und Pollenvitalität (PV) waren vom Genotyp und Ploidiegrad abhängig. Zwischen PV und Samenanlagenvitalität bestand eine enge positive Korrelation. Amphidiploide Pflanzen ($2n = 4x = 82$) bildeten Pollenkörner mit höherer Vitalität und mehr vitale Samenanlagen als amphiploide Pflanzen ($2n = 2x = 41$). Die PV wurde vom Verhalten der Chromosomen und der Entwicklung normaler Pollenmutterzellen während der Mikrosporogenese bestimmt. Mit steigendem Anteil bivalenter Chromosomen und homogen ausgebildeten Mikrosporen erhöhte sich die Pollenvitalität. Geringe PV war mit einer hohen Anzahl univalenter Chromosomen in den frühen Phasen der Pollenbildung und abnormer Mikrosporenentwicklung kombiniert. Die Kreuzungseltern *C. persicum*, *C. purpurascens* und *C. hederifolium* bildeten meist homogene Mikrosporen und einen höheren Anteil vitaler Pollenkörner und Samenanlagen. Amphidiploide Hybriden haben bessere Voraussetzungen für die generative Reproduktion als amphiploide.

2.2 Einleitung

Um interspezifische Hybriden für Züchtungsprogramme zu nutzen und in der Praxis zu etablieren, sind Kenntnisse ihrer generativen Eigenschaften notwendig. Eine wichtige Voraussetzung für die Befruchtung und nachfolgende Samenbildung sind die Vitalität von Pollen und Samenanlagen. Die Pollenvitalität wird sowohl genetisch als auch von Umweltfaktoren bestimmt. Aus der Literatur ist bekannt, dass bei interspezifischen

Hybriden, die Pollenvitalität reduziert und die Samenbildung gestört sein kann (Chen et al., 2003; Nimura et al., 2003; Zhao et al., 2007; Bolaños-Villegas et al., 2008).

Für Cyclamen bestätigen das die Untersuchungen von Ishizaka und Uematsu, 1992; Kobayashi und Ogawa, 1994; Ishizaka, 1996; Ewald et al., 2000 und Ishizaka, 2003. Die Ursachen für reduzierte Pollenvitalität waren hier genetisch bedingt. Ein wichtiger Umweltfaktor ist die Temperatur. Die Sensibilität gegenüber der Temperatur variiert in den verschiedenen Phasen der Pollenentwicklung (Satake und Hyase, 1970; Issarakraisila und Considine, 1994; Mercado et al., 1997). Über den Einfluss der Temperatur berichten auch Issarakraisila und Considine (1994) sowie Mutton et al. (1987). Über Faktoren, die die Vitalität der Samenanlagen beeinflussen, wird in der Literatur nur wenig berichtet. Cerovic et al. (2000) beschreiben den Einfluss der Temperatur und Fortescue und Turner (2004) machen Störungen in der Makrosporogenese für Unterschiede in der Vitalität verantwortlich.

Die eigenen Untersuchungen befassen sich mit vergleichenden Untersuchungen zur Vitalität des Pollens und der Samenanlagen von Kreuzungseltern und interspezifischen Cyclamen-Hybriden die zeitgleich aus der Kombination von verschiedenen *C. persicum*-Sorten mit zwei Wildarten entstanden. Dabei wurden Ursachen für Unterschiede in der Pollenvitalität analysiert. Analog der Ergebnisse aus der Literatur sind für die eigenen Hybriden Störungen bei der Pollenbildung sowie der Pollen- und Samenanlagenqualität zu vermuten.

2.3 Material und Methoden

2.3.1 Pflanzenmaterial

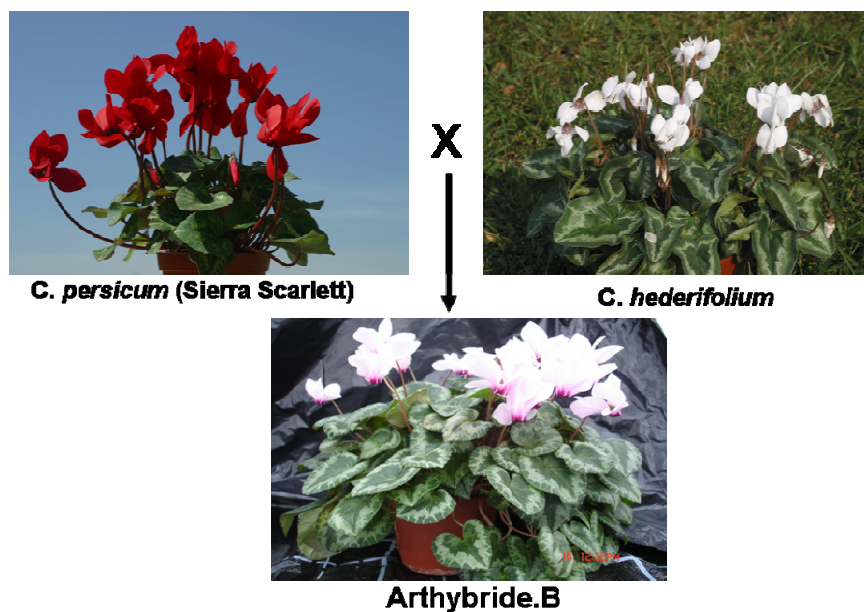
Acht *C. persicum*-Sorten ($2n=2x=48$) wurden mit den Wildarten *C. purpurascens* MILL. ($2n = 2x = 34$) oder *C. hederifolium* AIT. ($2n = 2x = 34$) als väterlicher Partner kombiniert. Kreuzungsarbeiten, In-vitro-Arbeiten, Anzucht und Kultivierung der Hybriden erfolgten zeitgleich unter identischen Bedingungen.

Kreuzungskombinationen:

A- *C. persicum* cv. 'Miracle Purple' x *C. hederifolium*

B- *C. persicum* cv. 'Sierra Scarlet' x *C. hederifolium*

C- *C. persicum* cv. 'Sierra Rose' x *C. hederifolium*



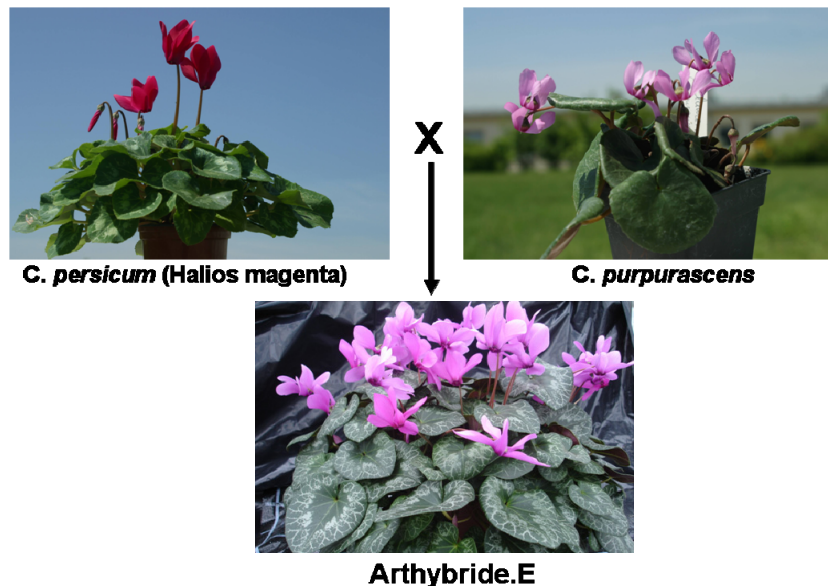
Fotos: A. Ewald

E- *C. persicum* cv. 'Halios' magenta x *C. purpurascens*

F- *C. persicum* cv. 'Halios' rot x *C. purpurascens*

G- *C. persicum* cv. 'No Name' rot x *C. purpurascens*

H- *C. persicum* cv. 'Maxora' rot x *C. purpurascens*



Fotos: A. Ewald

Die interspezifischen Hybriden entstanden nach einer Methode von Ishizaka und Uematsu (1990, 1992). Der Nachweis des Ploidiegrades erfolgte vor Beginn der Untersuchungen durch Bestimmung des relativen DNA-Gehaltes mit einem Ploidy Analyzer PA (Partec, Münster, Germany) und der somatischen Chromosomenzahl. Amphidiploide Hybriden entstanden spontan während des Embryo rescue.

2.3.2 Methoden

2.3.2.1 Pollenvitalität

Von den Kreuzungspartnern wurden jeweils zehn Pflanzen und von jeder Kreuzungskombination 25 amphiploide Pflanzen ($2n = 2x = 41$) analysiert. Aus den Kombinationen A, C, F und G wurden jeweils zehn amphidiploide Pflanzen ($2n = 4x = 82$) geprüft.

In den anderen Kombinationen waren keine amphidiploiden vorhanden. Von jeder Pflanze wurde ein Pollengemisch von je drei Blüten ein bis drei Tage vor Anthesebeginn bis unmittelbar zu Anthesebeginn verwendet. Die Proben wurden dreimalig im Abstand von zwei Monaten (Dezember, Februar und April) gewonnen und ausgewertet. Die Bestimmung der Pollenvitalität (PV) erfolgt nach Kison und Franke (1980) mittels Fluoreszeindiacetat (FDA). Zur Auswertung kamen 3x300 Pollenkörner je Pollenprobe. Dabei galten die grün-gelb fluoreszierenden Pollenkörnern als vital und schwach bzw. nicht fluoreszierende als nicht vital.

2.3.2.2 Vitalität der Samenanlagen

Von jedem Genotyp wurden, mit Ausnahme der mütterlichen Partner, von sechs Pflanzen jeweils drei Blüten pro Pflanze analysiert. Von *C. persicum* konnten nur drei Sorten einbezogen werden. Die Fruchtknoten wurden einen Tag vor der Anthese isoliert und die Placenta mit Samenanlagen für drei Stunden dunkel bei 35°C in 1%iger TTC-Lösung (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid) gefärbt. Rot gefärbte Samenanlagen wurden als vital eingestuft.

2.3.2.3 Mikrosporogenese

Von jeder Kreuzungskombination wurden 5-7 Pflanzen mit unterschiedlicher PV ausgewählt. Vergleichende Untersuchungen erfolgten an den Kreuzungseltern (3-5 Pflanzen). Von jeder Pflanze wurden 2-3 Blüten analysiert und 40 Pollenmutterzellen (PMZ) ausgewertet. Für die Analyse der frühen Stadien der Pollenbildung wurden Blüten verwendet, deren Petalen ca. 1 mm sichtbar waren. Für die Tetradenanalyse hatten die Petalen eine Größe von ca. 3 mm. Die Antheren wurden in einem Gemisch aus Ethanol (90%ig) und Essigsäure (99%ig) im Verhältnis (3:1) für mindestens 24 Stunden bei +4°C fixiert. Die Färbung erfolgte mit 3,8%iger Karminsalzsäure für zwei Tage bei +4°C. Zur mikroskopischen Auswertung wurde zusätzlich mit 4%iger Karminessigsäure gefärbt.

2.3.2.4 Mikroskopische Analysen

Die Untersuchungen wurden mit einem Leitz DM RB Mikroskop unter Auflichtfluoreszenz oder Durchlicht durchgeführt.

2.3.2.5 Statistische Analysen

Für die statistische Analyse der Daten wurde das Software-Paket Statistika 6.1 (Statsoft, Tulsa, USA) verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte durch einfaktorielle Varianzanalysen und anschließende Mittelwertvergleiche mittels Tukey HSD Test bei $\alpha = 0,05$ und Korrelationsanalysen.

2.4 Ergebnisse

2.4.1 Pollenvitalität

Die mittlere Pollenvitalität (PV) der Kreuzungseltern variierte genotypabhängig (Abb. 1). Der Abnahmetermin hatte keinen Einfluss. Die signifikant geringste PV zeigten *C. purpurascens* mit 46,4% und *C. persicum* „Halios“ magenta (Hm) und „Maxora“ rot (Mr) mit 44,6% und 43,7%.

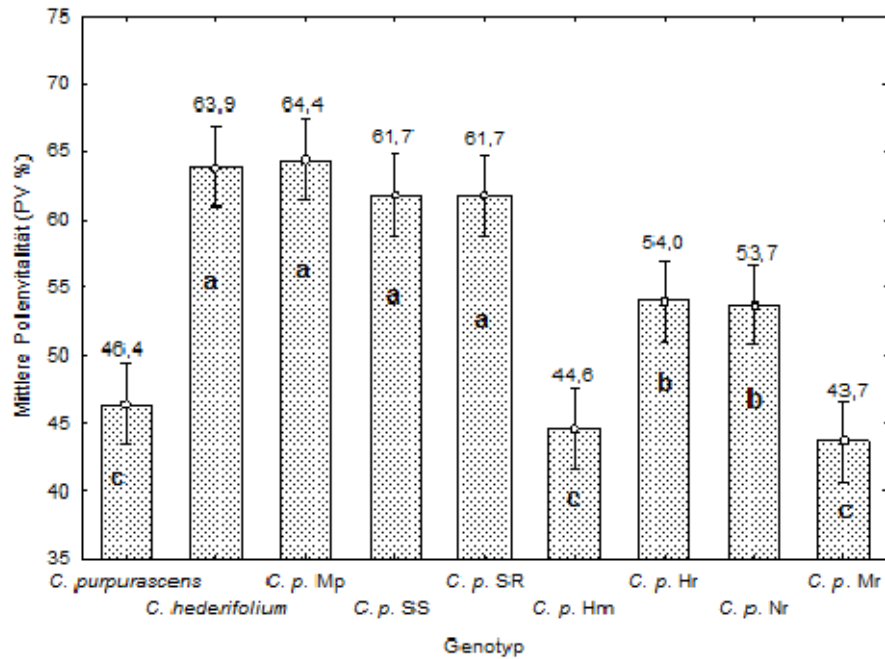


Abb. 1. Vergleich der mittleren Pollenvitalität der Kreuzungseltern *C. persicum*: Miracle Purple = Mp, Sierra Scarlett = SS, Sierra Rose = SR, Halios magenta = Hm, Halios rot = Hr, No Name rot = Nr und Maxora rot = Mr; Die Varianzanalyse ergab einen signifikanten Effekt: $F(8, 18) = 34,916$, $p = 0,000$; (Werte mit unterschiedlichen Buchstaben sind bei $p \leq 0,05$ signifikant voneinander verschieden)

Bei den amphiploiden Hybriden war die mittlere PV sehr niedrig. Werte von 5,3% wurden nicht überschritten (Abb. 2). Die Kombinationen mit *C. hederifolium* (A, B, C) hatten im Mittel eine höhere Vitalität als die mit *C. purpurascens*. Die geringste mittlere PV hatten Pflanzen der Kombinationen E und H mit 2,2% (Min = 0,32, Max = 7,57%) und 1,5% (Min = 0,07, Max = 4,56%)

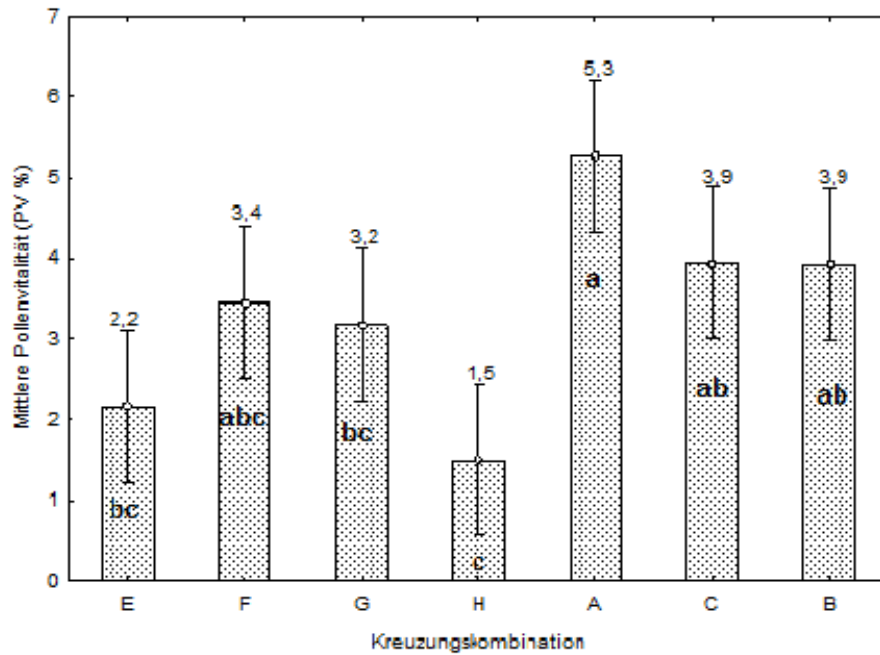


Abb. 2. Vergleich der mittleren Pollenvitalität amphiploider Hybriden aus verschiedenen Kreuzungskombinationen; Die Varianzanalyse ergab einen signifikanten Effekt: $F(6, 168) = 6,7386$, $p=0,000$; (Werte mit unterschiedlichen Buchstaben, sind bei $p \leq 0,05$ signifikant voneinander verschieden)

Im Gegensatz zu den amphiploiden hatten die amphidiploiden Pflanzen eine signifikant höhere PV (Abb. 3). Dieser variierte im Mittel zwischen 29,1% und 59,5%. Pflanzen aus den Kombinationen *C. persicum* x *C. hederifolium* hatten auch hier eine höhere PV (35,1-59,5%). Kombination C zeigte mit 59,5% die signifikant höchste PV.

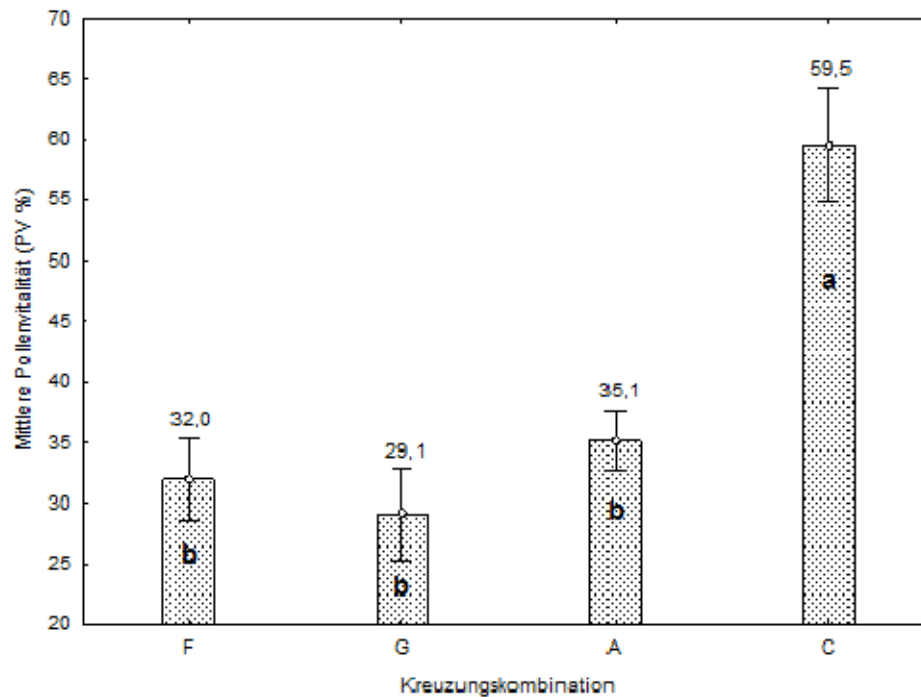


Abb. 3. Vergleich der Pollenvitalität amphidiploider Hybriden aus verschiedenen Kreuzungskombinationen. Die Varianzanalyse ergab einen signifikanten Effekt: $F(3, 36) = 71,672$, $p=0,000$; (Werte mit unterschiedlichen Buchstaben, sind bei $p \leq 0,05$ signifikant voneinander verschieden).

2.4.2 Vitalität der Samenanlagen

Die mittlere Vitalität der Samenanlagen war genotypabhängig (Abb. 4). Von den Kreuzungseltern hatte *C. purpurascens* mit 88,5% den signifikant niedrigsten Wert. Die Vitalität der *C. persicum*-Sorten lag zwischen 98,0% und 100,0%. Amphiploide Kreuzungskombinationen hatten signifikant niedrigere Werte. Pflanzen aus den Kreuzungskombinationen E und H hatten wie auch bei der PV mit 72,2% und 76,2% die geringste mittlere Vitalität.

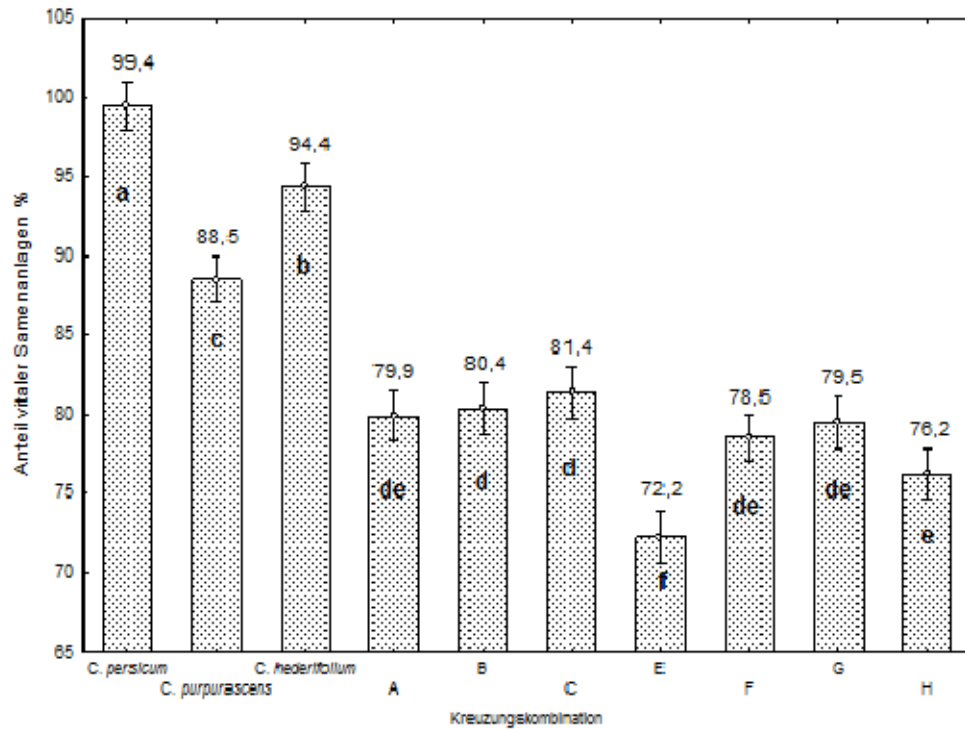


Abb. 4. Vergleich der mittleren Vitalität der Samenanlagen der Elternformen und amphiploider Hybriden aus verschiedenen Kreuzungskombinationen; Die Varianzanalyse ergab einen signifikanten Effekt: $F(9, 54) = 124,42$, $p = 0,000$; (Werte mit unterschiedliche Buchstaben sind bei $p \leq 0,05$ signifikant voneinander verschieden).

Amphidiploide Pflanzen bildeten signifikant vitalere Samenanlagen als amphiploide. Die Vitalität lag zwischen 91,3 und 92,6 %. Abbildung 5 zeigt deutlich die Unterschiede zwischen vitalen und nichtvitalen Samenanlagen nach Tetrazoliumfärbung. Bei vitalen Samenanlagen ist insbesondere der Embryosack intensiv rot gefärbt. Nicht vitale Samenanlagen sind nicht bzw. nur schwach gefärbt.

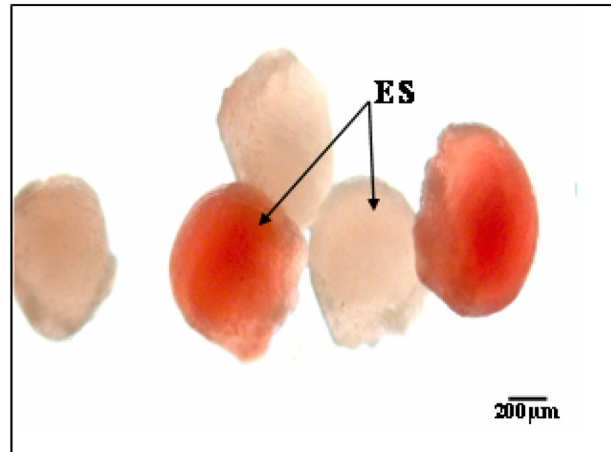


Abb. 5. Nachweis der Samenanlagenvitalität nach Tetrazolium-Färbung, vitale Samenanlagen intensiv rot gefärbt, ES - Embryosack.

Zwischen Pollenvitalität und Samenanlagenvitalität bestand mit $r=0,92$ eine enge Korrelation.

2.4.3 Mikrosporogenese

Bei amphiploiden Pflanzen wurden in der Metaphase I Unregelmäßigkeiten beobachtet die sich in einer hohen Anzahl von Univalenten, wenigen Bivalenten (nur Stabbivalente, keine Ringbivalente), Trivalenten und Multivalenten äußerten (Abb. 6A mit einem Multivalent M, vier Trivalenten III, drei Bivalenten II und 15 Univalenten I).

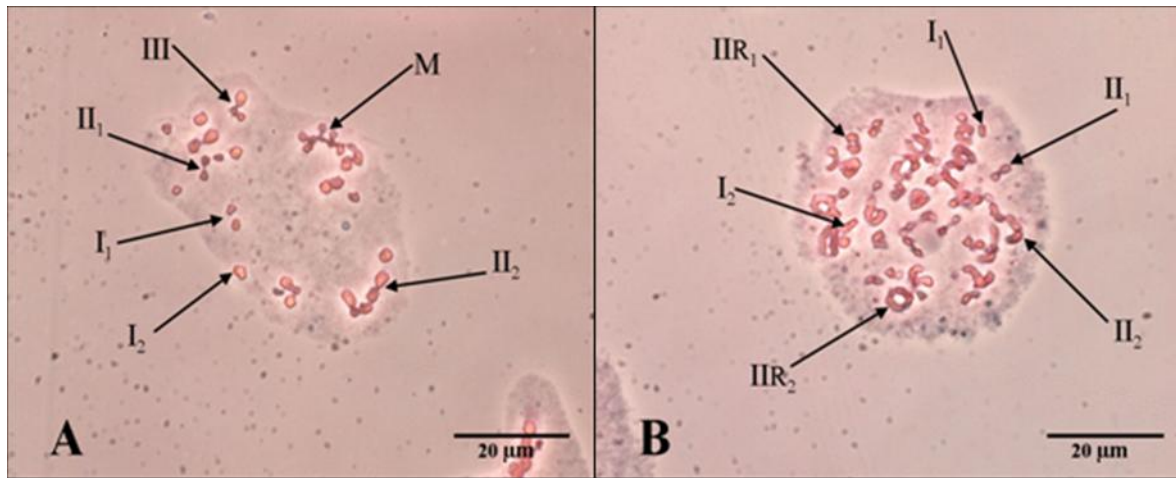


Abb. 6. Syndeseverhalten interspezifischer Hybriden aus der Kreuzungskombination *C. persicum* x *C. purpurascens* während der Mikrosporogenese, A: amphiploide Pflanze, Metaphase I, B: amphidiploide Pflanze, Diplotän, I₁ = Univalent von *C. persicum*, I₂ = Univalent von *C. purpurascens*, II₁ = Stabbivalent von *C. persicum*, II₂ = Stabbivalent von *C. purpurascens*, IIR₁ = Ringbivalent von *C. persicum*, IIR₂ = Ringbivalent von *C. purpurascens* T = Trivalent, M = Multivalent.

Amphidiploide PMZ bildeten im Diplotän und in der Metaphase I eine hohe Anzahl von Bivalenten (Ringbivalente und Stabbivalente) und wenige Univalente, jedoch keine Trivalente oder Multivalente (Abb. 6B mit 35 Bivalenten und 12 Univalenten). In der Telophase I zeigte sich ein hoher Anteil zwei gleich großer Dyaden mit je 41 Chromosomen und vier optisch gleich großen Mikrosporen in der Telophase II.

Der Anteil normaler Mikrosporen im Tetradenstadium korrelierte positiv ($r = 0,91$) mit der PV (Tabelle 1). Die PV lag bei den amphiploiden Pflanzen (jeweils zwei pro Genotyp dargestellt) zwischen 0,2 und 11,8%. Der Anteil normaler Mikrosporen variierte zwischen 0,0 und 20,0% (Tabelle 1). Der Anteil anomaler Mikrosporen (vier optisch ungleiche Mikrosporen) betrug 47,5 – 77,5%, der Anteil Triaden (eine Dyade und zwei Mikrosporen) 7,5 – 27,5% und der der Dyaden 10,0 – 20,0 %. Mikronuklei wurden bei allen Mikrosporen-Typen beobachtet.

Der Anteil PMZ mit einem Mikronukleus betrug 5,0 – 15,0% und der mit zwei Mikronuklei 0,0 – 5,0% (Tabelle 1). Die Abbildungen 7A und 7B zeigen das Auftreten von Unregelmäßigkeiten im Tetradenstadium einer amphiploiden Pflanze.

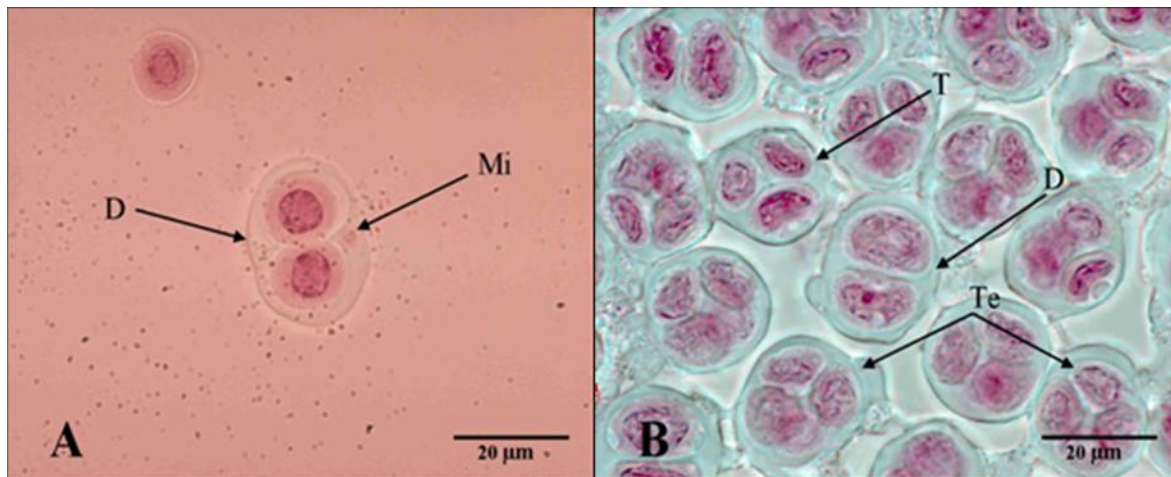


Abb. 7. PMZ einer amphiploiden Hybride im Tetradenstadium der Mikrosporogenese A – Dyade mit einem Mikronukleus, B- PMZ mit Dyaden, Triaden und Tetraden, D = Dyade, Mi = Mikronukleus, T = Triade, Te = Tetrade

Bei amphidiploiden Pflanzen (A, B, F und G), mit einer PV von 19,5 bis 64,8%, lag der Anteil normaler Mikrosporen im Tetradenstadium mit 45,0 – 90,0% deutlich über dem der amphiploiden Hybriden (Tabelle 1). Der Anteil anomaler Mikrosporen betrug 5,0 – 40,0%, der der Triaden 5,0 – 20,0%. Der Anteil PMZ mit einem Mikronukleus lag zwischen 0,0 und 7,5%. PMZ mit zwei Mikronuklei und Dyaden wurden im Gegensatz zu amphiploiden PMZ nicht beobachtet.

Tabelle 1. Pollenvitalität (PV%) und Anteil verschiedener Mikrosporen-Typen im Tetradenstadium (%) der Mikrosporogenese bei ausgewählten amphiploiden und amphidiploiden Hybriden, zwei Pflanzen pro Kombination, n = 40 PMZ, PV = mittlere Pollenvitalität in %, A = vier homogene Mikrosporen, Aa = vier ungleiche Mikrosporen, A1 = vier Mikrosporen mit einem Mikronukleus, A2 = vier Mikrosporen mit zwei Mikronuklei, B = Dyade, B1 = Dyade mit einem Mikronukleus, B2 = Dyade mit zwei Mikronuklei, C = Triaden (drei Mikrosporen), C1 = Triaden mit einem Mikronukleus, C2 = Triaden mit zwei Mikronuklei

| Kreuzungs kombinationen | PV % | Tetraden | | | | Dyaden | | | Triaden | | |
|----------------------------|---------|----------|------|------|-----|--------|------|-----|---------|------|-----|
| | | A | Aa | A1 | A2 | B | B1 | B2 | C | C1 | C2 |
| amphiploid | | | | | | | | | | | |
| A 1 | 7,1 | 15,0 | 50,0 | 10,0 | 0,0 | 12,5 | 7,5 | 2,5 | 22,5 | 7,5 | 0,0 |
| A 2 | 2,5 | 5,0 | 62,5 | 12,5 | 0,0 | 20,0 | 15,0 | 2,5 | 12,5 | 5,0 | 2,5 |
| B 1 | 1,1 | 5,0 | 62,5 | 12,5 | 0,0 | 15,0 | 10,0 | 2,5 | 17,5 | 5,0 | 2,5 |
| B 2 | 6,8 | 15,0 | 50,0 | 10,0 | 0,0 | 12,5 | 7,5 | 0,0 | 22,5 | 5,0 | 0,0 |
| C 1 | 0,9 | 2,5 | 70,0 | 12,5 | 0,0 | 20,0 | 10,0 | 5,0 | 7,5 | 5,0 | 0,0 |
| C 2 | 5,4 | 15,0 | 54,0 | 7,5 | 0,0 | 14,0 | 5,0 | 2,5 | 17,0 | 5,0 | 0,0 |
| E 1 | 10,0 | 20,0 | 52,5 | 10,0 | 0,0 | 12,5 | 7,5 | 0,0 | 15,0 | 10,0 | 0,0 |
| E 2 | 0,2 | 5,0 | 67,5 | 12,5 | 5,0 | 15,0 | 7,5 | 5,0 | 12,5 | 7,5 | 2,5 |
| F 1 | 0,3 | 0,0 | 60,0 | 10,0 | 2,5 | 12,5 | 10,0 | 2,5 | 27,5 | 10,0 | 5,0 |
| F 2 | 11,8 | 15,0 | 47,5 | 7,5 | 0,0 | 15,0 | 7,5 | 2,5 | 22,5 | 10,0 | 0,0 |
| G 1 | 0,6 | 0,0 | 77,5 | 12,5 | 0,0 | 12,5 | 7,5 | 2,5 | 10,0 | 7,5 | 2,5 |
| G 2 | 10,2 | 15,0 | 50,0 | 7,5 | 0,0 | 10,0 | 5,0 | 0,0 | 25,0 | 10,0 | 0,0 |
| H 1 | 0,1 | 2,5 | 70,0 | 15,0 | 0,0 | 12,5 | 7,5 | 5,0 | 15,0 | 7,5 | 0,0 |
| H 2 | 9,5 | 20,0 | 50,0 | 17,5 | 0,0 | 10,0 | 5,0 | 2,5 | 20,0 | 10,0 | 0,0 |
| amphidiploid | | | | | | | | | | | |
| A 1 | 30,4 | 62,5 | 20,0 | 5,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 17,5 | 5,0 | 0,0 |
| A 2 | 23,3 | 50,0 | 30,0 | 7,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 20,0 | 7,5 | 0,0 |
| C 1 | 64,8 | 90,0 | 5,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 5,0 | 0,0 | 0,0 |
| C 2 | 49,4 | 77,5 | 10,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 12,5 | 5,0 | 0,0 |
| F 1 | 20,4 | 45,0 | 37,5 | 7,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 17,5 | 7,5 | 0,0 |
| F 2 | 37,0 | 65,0 | 22,5 | 2,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 12,5 | 2,5 | 0,0 |
| G 1 | 26,7 | 55,0 | 32,5 | 5,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 12,5 | 7,5 | 0,0 |
| G 2 | 19,5 | 50,0 | 40,0 | 7,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 10,0 | 5,0 | 0,0 |

Die Kreuzungseltern *C. persicum*, *C. purpurascens* und *C. hederifolium* bildeten im Tetradenstadium einen hohen Anteil normaler Mikrosporen (optisch vier gleich große Mikrosporen). Ihr Anteil betrug bei *C. persicum* 75,0 bis 90,0%, bei *C. purpurascens* 75,0% und bei *C. hederifolium* 80,0%. Der Anteil Triaden (zwei gleiche großen Mikrosporen und eine größere Mikropore) war mit 5,0 – 15,0% gering. Mikronuklei und Dyaden wurden im Tetradenstadium nicht beobachtet. Die frühen Stadien der Mikrosporogenese wurden nicht analysiert. Zwischen PV und dem Anteil normaler Mikrosporen bestand eine positive Korrelation von $r = 0,71$.

2.5 Diskussion

Da Entstehung und Kultivierung der verschiedenen Kreuzungskombinationen über den gleichen Zeitraum unter gleichen Versuchsbedingungen erfolgte, bestand die Möglichkeit einer Vergleichbarkeit generativer Merkmale von interspezifischen Cyclamen-Hybriden mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund. Grundlage für die Befruchtung und Samenbildung sind vitale Pollenkörner und Samenanlagen.

Wie vermutet, traten bei den eigenen Hybriden Störungen bei der Pollenbildung auf. Amphidiploide Hybriden bildeten im Vergleich zu amphiploiden signifikant vitaleren Pollen und Samenanlagen.

Das bestätigt die Ergebnisse zur Pollenvitalität von Ishizaka und Uematsu (1994, 1995b) und Ewald et al. (2000). Ishizaka und Uematsu (1992) berichten bei amphiploiden Hybriden zwischen *C. persicum* und *C. hederifolium* von der Ausbildung von sterilem Pollen. Zhao et al. (2007); Nimmura et al. (2003) und Nimmura et al. (2006) kamen bei interspezifischen und creeping bentgrass-Hybriden bzw. interspezifischen Dianthus-Hybriden zu ähnlichen Ergebnissen.

Die eigenen Hybriden mit *C. hederifolium* als väterlichen Kreuzungspartner hatten eine höhere mittlere Vitalität des Pollens und der Samenanlagen als die mit *C. purpurascens* als väterlicher Partner. Da aber die mütterlichen Kreuzungspartner andere als in den Kombinationen mit *C. purpurascens* waren, kann keine Verallgemeinerung vorgenommen werden.

Es gibt zahlreiche Publikationen, die analog der eigenen Ergebnisse einen Zusammenhang zwischen dem Verhalten der Chromosomen während der Meiose und der Pollenvitalität beschreiben (Singh, 2003; Souza et al., 2003; Bolaños-Villegas et al., 2008; Chelysheva et

al., 2007; Zhao et al., 2007). Bei verschiedenen interspezifischen Cyclamen-Hybriden wurde die Sterilität der Hybriden mit einem niedrigen Anteil von Bivalenten in der Metaphase I und dem anomalen Verhalten der Chromosomen in der Telophase I (PMZ mit zwei ungleichen Mikrosporen) und Telophase II (PMZ mit vier ungleichen Mikrosporen) begründet (Ishizaka und Uematsu, 1994; Ishizaka, 1998; Ewald et al., 2000; Ishizaka, 2003). Auch in den eigenen Arbeiten war der Anteil homogen ausgebildete PMZ positiv korreliert mit der PV. Die bei der Analyse der Mikrosporogenese gefundenen Triaden bestanden aus zwei gleich großen Mikrosporen und eine größeren Mikrospore. Die größere Mikrospore entstand wahrscheinlich durch Restitutionskernbildung in der Meiose II (Caetano-Pereira et al., 1998; Ewald et al., 2000). Auffallend war bei den amphiploiden Hybriden die hohe Anzahl von Dyaden mit ein oder zwei Mikronuklei. Ursachen dafür können Chromosomenbrüche oder Chromosomen-Fehlverteilungen infolge der Inhomologie der verschiedenen Elternchromosomen sein. Das Auftreten von Triaden bei den Kreuzungseltern *C. persicum*, *C. purpurascens* und *C. hederifolium*, wenngleich in geringer Anzahl, deutet aber auch hier auf Störungen in der Pollenbildung hin. Goluboskaya (1989) und Bosco et al. (1999) bringen die Bildung von Monaden, Dyaden, Triaden und Polyaden mit der Bildung von Gameten mit höherer oder verminderter Chromosomenzahl und mit der Bildung unreduzierter Gameten in Zusammenhang.

Die Tetrazolium-Färbung wird zur Bestimmung der Lebensfähigkeit von Samen (Moore, 1986), Pollenkörnern (Kison und Franke, 1980) und Samenanlagen angewandt (Marr und Pellmyr, 2003). Zwischen Pollen- und Samenanlagenvitalität bestand in den eigenen Untersuchungen eine enge positive Korrelation. Fortescue und Turner (2004) kamen bei *Musa* zu einem ähnlichen Ergebnis. Es ist zu vermuten, dass bei Pflanzen mit Unregelmäßigkeiten in der Mikrosporenbildung auch Unregelmäßigkeiten in der Makrosporogenese bestehen, offenbar aber in geringerem Umfang. Bei dem eigenen Material lag der Anteil lebensfähiger Samenanlagen bei amphi- als auch bei amphidiploiden Pflanzen weit über dem der PV.

Somit wären die meisten Samenanlagen amphi- und amphidiploider Pflanzen befruchtungsfähig, vorausgesetzt, dass nach der Bestäubung keine weiteren Faktoren die Befruchtung und Samenbildung beeinflussen. Nach Reinhardt (2006) entwickelten sich bei diploiden *Cyclamen persicum* Genotypen nur ca. 20% der Samenanlagen zu Samen.

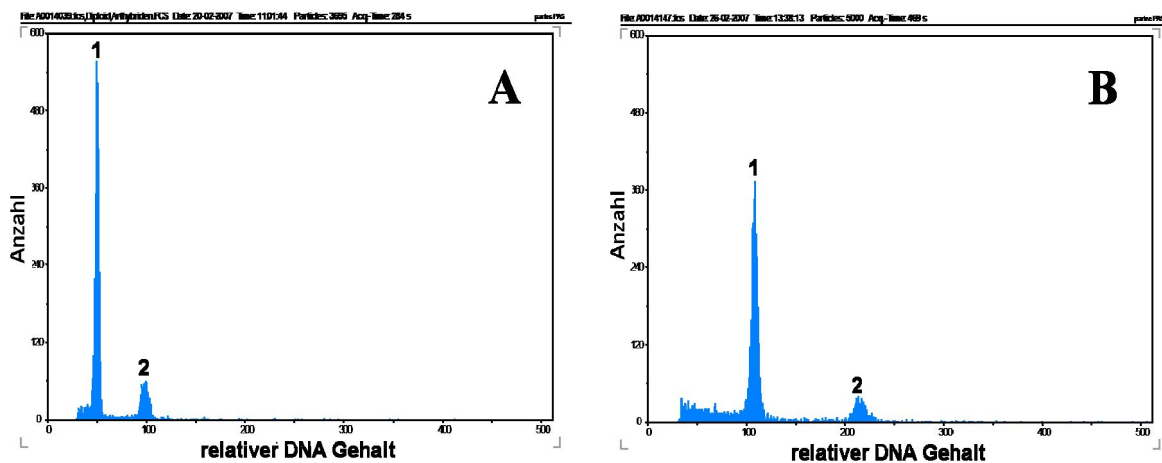
Die Untersuchungen zeigen, dass amphidiploide Hybriden bessere Voraussetzungen für die generative Vermehrbarkeit und die Einbeziehung in Züchtungsprogramme haben als

amphiploide. Interspezifische Cyclamen-Hybriden sind nur über In-vitro-Kultur in größeren Stückzahlen vermehrbar (mündliche Mitteilung, Ewald). Diese Methode ist zeit- und kostenaufwändig. Bei der Vermehrung über Samen wäre eine bessere Steuerbarkeit der Kultur und eine Verbreiterung der Selektionsbasis für die Züchtung möglich. Weitere Untersuchungen zur Samenvermehrbarkeit amphidiploider Cyclamen-Hybriden sind notwendig.

Kapitel 3



Pollenschlauchwachstum



Histogramme zum relativen DNA Gehalt interspezifischer Hybriden
(A=Amphiploid, B=Amphidiploid)

3 Untersuchungen zur Befruchtung und Samenbildung interspezifischer Cyclamen-Hybriden

3.1 Zusammenfassung

Bei interspezifischen Hybriden zwischen *Cyclamen persicum* cv. x *C. purpurascens* und *C. persicum* cv. x *C. hederifolium* wurden unter Einbeziehung der Kreuzungseltern vergleichende Untersuchungen zum Pollenschlauchwachstum (PSW) und zur Gewebedifferenzierung in den Samenanlagen, als Voraussetzungen für die Samenbildung, durchgeführt. Nach intraspezifischer Kombination wurde bei amphidiploiden Hybriden PSW im Griffel, Pollenschlauchpenetration in die Mikropylen der Samenanlagen und Gewebedifferenzierung nachgewiesen. Bei amphiploiden Pflanzen dagegen fand im Versuchszeitraum keine Penetration und Gewebedifferenzierung statt.

Nach intraspezifischen Kombinationen amphidiploider Pflanzen durchwuchsen deutlich mehr Pollenschläuche den Griffel als in amphiploiden Kombinationen.

In den Fruchtknoten von *C. persicum* cv. wurden mehr Samenanlagen als bei den väterlichen Partnern *C. purpurascens* oder *C. hederifolium* gebildet. *C. purpurascens* hatte weniger Samenanlagen als *C. hederifolium*. Auch die mittlere Anzahl Pollenschläuche (PS) im Griffel und der mittlere Anteil der in die Mikropylen penetrierten PS waren nach interspezifischer Kombination bei *C. hederifolium* deutlich höher als bei *C. purpurascens*. Die Samenanlagenzahl differierte auch zwischen den *C. persicum*-Sorten und den Hybriden. Bei den Hybriden waren die mittlere Anzahl Samenanlagen und das Pollenschlauchwachstum (PSW) vom Genotyp bzw. Kreuzungspartner abhängig. Kombinationen amphiploid x amphiploid, amphiploid x amphidiploid und reziprok sind offenbar nicht möglich. Bei Rückkreuzungen mit den Elternformen *C. persicum* cv. und *C. purpurascens* oder *C. hederifolium* war nur auf amphidiploidem Niveau eine Penetration der PS in die Mikropylen nachweisbar.

Nach Kombinationen zwischen amphiploiden Partnern abortierten bis zur 6. Woche nach der Bestäubung alle Blüten. Aborte traten dagegen bei amphidiploiden Hybriden nicht auf und in den Samenanlagen war eine deutliche Endosperm Bildung nachweisbar. Der 6C/3C Mitoseindex des Endosperms war bei amphidiploiden *C. hederifolium*-Hybriden im

Gegensatz zu amphidiploiden *C. pururascens*-Hybriden, über alle Termine signifikant niedriger, d. h. die Samenbildung verlief zügiger. Amphidiploide Hybriden zwischen *C. persicum* cv. x *C. hederifolium* zeigten insgesamt bessere Voraussetzungen für die generative Reproduktion. Als eine Ursache für die fehlende Samenbildung bzw. die Aborte nach der Bestäubung wird bei amphiploiden Hybriden das Ausbleiben der Befruchtung in Kombination mit geringer Pollenvitalität vermutet.

3.2 Einleitung

Mit Hilfe des Embryo rescue's entstanden in der Vergangenheit verschiedene Hybriden zwischen *C. persicum* und anderen Cyclamen-Arten (Ishizaka und Uematsu, 1990; Ishizaka und Uematsu, 1992; Kobayashi und Ogawa, 1994; Ishizaka und Uematsu, 1995a; Ewald, 1996; Ishizaka, 1996).

Amphidiploide Hybriden, die durch induzierte Chromosomenzahlverdopplung oder auch spontan entstanden, zeigten bei verschiedenen Gattungen bessere Voraussetzungen für die generative Reproduktion als amphiploide. So hatten amphidiploide Cyclamen-Hybriden eine höhere Pollenvitalität als amphiploide und bildeten einige wenige Samen (Ishizaka und Uematsu, 1994, 1995b; Ewald et al., 2000; Ishizaka, 2008). Auch Chen et al. (2002; 2003) berichten bei amphidiploiden Cucumis-Hybriden, und Nimmura et al. (2006) bei Dianthus-Hybriden, über höhere Fertilität und Samenvermehrbarkeit. Amphiploide Hybriden waren steril und nicht samenvermehrbar. Milan, (2008) berichtet bei Amaranth über eine höhere Pollenvitalität amphidiploider Pflanzen. Die Samenproduktion der Pflanze ist das Ergebnis einer erfolgreichen Bestäubung und Befruchtung, die von zahlreichen Faktoren beeinflusst wird, wie der Vitalität von Pollen und Samenanlagen (Quesada et al., 1996; Zhao et al., 2009), Pollen- Pistill- Interaktionen (Mazzucato et al., 2003) oder der Narbenmorphologie.

Chemotropische Signale anomaler Samenanlagen im Fruchtknoten können das PSW stören oder das Fassungsvermögen der Narbe für die Pollenkörner ist zu gering (Teng et al., 2006). Eine große Rolle spielen die Inkompatibilität zwischen den Genotypen (Geerts et al., 2002) und Inzuchtdepressionen (Araujo, 2007; Zhao et al., 2009). Zudem haben Umweltfaktoren Einfluss auf die komplexen Entwicklungsprozesse während der Befruchtung und Samenbildung. So fanden Haselberg et al. (2004) und Song et al. (2002)

eine Auswirkung der Temperatur auf das Pollenschlauchwachstum und die Lebensfähigkeit der Samenanlagen. Reife Pollen enthalten verschiedene Nährstoffe, die eine Voraussetzung für eine gute Pollenkeimung und das Pollenschlauchwachstum sind (Baker und Baker, 1979; Mascarenhas, 1989) und eine optimale Nährstoffversorgung der Samenträger voraussetzen.

Bei Hybriden ist geringe Pollenvitalität (PV) eine wichtige Ursache für die Verhinderung der Samenbildung. Dabei ist eine ungestörte Meiose mit regulärer Chromosomenpaarung Voraussetzung für die Bildung von funktionsfähigem Pollen. Es gibt zahlreiche Publikationen, die einen Zusammenhang zwischen geringer PV und Unregelmäßigkeiten in der Mikrosporogenese, bedingt durch fehlende Homologie der Chromosomen und fehlender oder geringer Samenbildung beschreiben wie Ishizaka (2003) bei interspezifischen Cyclamen-Hybriden sowie Li et al., 2005; Tang et al., 2009; Adamowski et al., 2008, Bolanos-Villegas et al., 2008 für weitere Kulturen. Auch Fu et al. (2007) fanden bei *Oryza* die Hybrid-Sterilität vor allem durch die stark anomale Meiose von Mikrosporogenese und Pollenmutterzellen verursacht.

Die Kenntnis generativer Eigenschaften neuer interspezifischer Hybriden ist eine Voraussetzung für ihre weitere züchterische Bearbeitung und Einführung in die gärtnerische Praxis. Neue amphidiploide Hybriden können eine nützliche Ressource für die Züchtung sein.

Ziel der vorliegenden Studie war der Gewinn von Kenntnissen zur Befruchtung und Gewebedifferenzierung in den Samenanlagen verschiedener interspezifischer Cyclamen-Hybriden, als Grundvoraussetzungen für die Samenbildung, im Vergleich untereinander und mit den Kreuzungseltern sowie die Ursachenfindung für fehlende oder verminderte Samenbildung.

3.3 Material und Methoden

3.3.1 Pflanzenmaterial

Zur Verfügung standen zeitgleich über embryo rescue entstandene amphiploide ($2n = 2x = 41$) und amphidiploide ($2n = 4x = 82$) Hybriden aus den Kreuzungskombinationen von sieben *C. persicum* MILL. Sorten ($2n = 2x = 48$) mit den Wildarten *C. purpurascens* MILL. ($2n = 2x = 34$) oder *C. hederifolium* AIT. ($2n = 2x = 34$) als väterliche Partner. In den Hybridgruppen A, C, F und G waren neben den amphiploiden Pflanzen auch spontan entstandene amphidiploide Pflanzen vorhanden.

Interspezifische Hybridgruppen

A- *C. persicum* cv. 'Miracle Purple' x *C. hederifolium*

B- *C. persicum* cv. 'Sierra Scarlet' x *C. hederifolium*

C- *C. persicum* cv. 'Sierra Rose' x *C. hederifolium*

E- *C. persicum* cv. 'Halios' magenta x *C. purpurascens*

F- *C. persicum* cv. 'Halios' red x *C. purpurascens*

G- *C. persicum* cv. 'No Name' red x *C. purpurascens*

H- *C. persicum* cv. 'Maxora' red x *C. purpurascens*

Die Pflanzen wurden bei 18 – 25 °C im Gewächshaus kultiviert.

3.3.2 Methoden

3.3.2.1 Pollenschlauchwachstum und Anzahl Samenanlagen

15 Blüten je Genotyp und Ploidiegrad wurden ca. 2-3 Tage vor der Anthese kastriert und mit einem Pollengemisch des entsprechenden Kreuzungspartners bestäubt. Nach 14 Tagen wurden Quetschpräparate hergestellt und die Anzahl Pollenschläuche im Griffel, der Anteil Fruchtknoten mit Pollenschläuchen im Placentabereich sowie der Anteil Samenanlagen mit Penetration durch Pollenschläuche wurden bestimmt. Zur Anfärbung

wurde Anilinblau verwendet (Naether, 1971). Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie (Leitz DMRB, LEICA, Germany).

Folgende Kombinationen wurden analysiert:

1. Kreuzungseltern intraspezifisch:

C. persicum x *C. persicum*. (CP x CP) sieben Sorten

C. purpurascens x *C. purpurascens* (Cp x Cp)

C. hederifolium x *C. hederifolium* (Ch x Ch)

2. Kreuzungseltern interspezifisch:

C. persicum. x *C. hederifolium* (CP x Ch) und reziprok

C. persicum x *C. purpurascens* (CP x Cp) und reziprok

3. Hybriden amphiploid (Hybridgruppen A, B, C, E, F, G, H):

Amphiploid x amphiploid (AP x AP)

Amphiploid x *C. persicum* (AP x CP) und reziprok (CP x AP)

Amphiploid x *C. purpurascens* (AP x Cp) und reziprok (Cp x AP)

Amphiploid x *C. hederifolium* (AP x Ch) und reziprok (Ch x AP)

4. Hybriden amphidiploid (Hybridgruppen A, C, F, G):

Amphidiploid x amphidiploid (AD x AD)

Amphidiploid x amphiploid x (AD x AP) und reziprok (AP x AD)

Amphidiploid x *C. persicum* (AD x CP) und reziprok (CP x AD)

Amphidiploid x *C. purpurascens* (AD x Cp) und reziprok (Cp x AD)

Amphidiploid x *C. hederifolium* (AD x Ch) und reziprok (Ch x AD)

Zur Ermittlung der Anzahl Samenanlagen, wurden jeweils zehn Quetschpräparate mittels Dunkelfeldmikroskopie (Leitz DMRB, LEICA, Germany) ausgewertet.

3.3.2.2 Flowcytometrische Messungen (Samenbildung)

Untersuchungen erfolgten hier nur mit den Hybridgruppen bei denen auch amphidiploide Pflanzen (A, C, F, G) entstanden waren. Von jeder Gruppe und Ploidiestufe wurden 30-45 Blüten kurz vor Anthesebeginn kastriert und bestäubt. Rückkreuzungen mit den Kreuzungseltern erfolgten nicht.

Kreuzungskombinationen:

Amphiploid x Amphiploid (AP x AP)

Amphidiploid x Amphidiploid (AD x AD)

Amphiploid x Amphidiploid (AP x AD) und reziprok (AD x AP)

Die Abnahme der Samenkapseln erfolgte wöchentlich sechs bis acht Wochen nach der Bestäubung. Von jeder Blüte wurde eine Mischprobe von 10-15 Samenanlagen geprüft. Die Samenanlagen wurden von der Plazenta abpräpariert und in 400 µl Partec CyStain UV Precise Nuclei Extraction Lösung (Partec GmbH, Germany), welche zuvor mit 1% Polyvinylpyrrolidon (Polyvidon 25, Merck) versetzt wurde, mit einer Rasierklinge zerkleinert und durch einen 50µl Filter gefiltert. Nach zwei Minuten erfolgte die Färbung in 1600 µl der Partec CyStain UV Precise Staining buffer Lösung (Partec GmbH, Germany), welche wiederum mit 1% Polyvinylpyrrolidon versetzt wurde. Nach weiteren zwei Minuten erfolgte die Analyse des relativen DNA-Gehaltes mit einem Flowcytometer PA (Partec, Münster). Es wurden jeweils 10000 Partikel analysiert.

3.3.2.3 Statistische Verfahren

Zur Auswertung und statistischen Analyse der gewonnen Ergebnisse dienten die Programme Microsoft Excel 2003 und Statistika 6.1 (Statsoft, Tulsa, USA).

Die Messdaten wurden varianzanalytisch mit ANOVA/MANOVA ausgewertet und die Mittelwertdifferenzen mit Tukey HSD Test's bei $\alpha = 0,05$ auf Signifikanz geprüft.

3.4 Ergebnisse

3.4.1 Anzahl Samenanlagen

Die mittlere Anzahl Samenanlagen pro Fruchtknoten war variabel und vom Genotyp abhängig. So hatten *C. persicum*-Sorten mehr Samenanlagen als *C. hederifolium* und *C. purpurascens* (Tab. 1). Die mittlere Anzahl Samenanlagen variierte bei den *C. persicum* - Sorten zwischen 148 und 231, *C. purpurascens* hatte im Mittel 106 und *C. hederifolium* 132 Samenanlagen. Die Hybriden A und B (*C. persicum* x *C. hederifolium*) bildeten im Mittel die meisten Samenanlagen während Hybriden der Kombination C ebenso wie der zugehörige mütterliche Partner die geringste Anzahl hatte. Amphiploide und amphidiploide Hybriden ließen keine Tendenz erkennen.

Tabelle 1. Vergleich der mittleren Anzahl Samenanlagen der Kreuzungspartner und ihrer Hybriden, AP = amphiploid, AD = amphidiploid, n = 10

| Genotyp | Mittlere Anzahl Samenanlagen | Min – Max |
|---|------------------------------|-----------|
| <i>C. persicum</i> cv. 'Miracle Purple' | 210 | 190 – 241 |
| <i>C. persicum</i> cv. 'Sierra Scarlet' | 231 | 192 – 264 |
| <i>C. persicum</i> cv. 'Sierra Rose' | 148 | 136 – 168 |
| <i>C. persicum</i> cv. 'Halios' magenta | 190 | 174 – 215 |
| <i>C. persicum</i> cv. 'Halios' rot | 183 | 170 – 200 |
| <i>C. persicum</i> cv. 'No Name' rot | 198 | 178 – 225 |
| <i>C. persicum</i> cv. 'Maxora' rot | 194 | 170 – 220 |
| <i>C. hederifolium</i> | 132 | 106 – 164 |
| <i>C. purpurascens</i> | 106 | 74 – 140 |
| Interspezifische Hybridgruppen | | |
| A (AP) | 224 | 215 – 245 |
| B (AP) | 198 | 172 – 240 |
| C (AP) | 136 | 114 – 164 |
| E (AP) | 158 | 145 – 174 |
| F (AP) | 142 | 124 – 162 |
| G (AP) | 173 | 150 – 194 |
| H (AP) | 151 | 142 – 164 |
| A (AD) | 211 | 196 – 242 |
| C (AD) | 147 | 124 – 162 |
| F (AD) | 148 | 134 – 168 |
| G (AD) | 160 | 146 – 174 |

3.4.2 Pollenschlauchwachstum

Nach den Bestäubungen waren in allen Kreuzungskombinationen im Griffel Pollenschläuche (PS) vorhanden (Tab. 2, 3). Sie durchwuchsen ihn ohne sichtbare Hemmreaktionen (Abb. 1A). Im Vergleich zur Anzahl vorhandener Samenanlagen war die Anzahl PS gering. Die intraspezifische Kombination der *C. persicum*-Genotypen ergab Unterschiede. Bei *C. persicum* cv. 'Miracle Purple', *C. persicum* cv. 'Sierra Scarlet' und *C. persicum* cv. 'Sierra Rose' durchwuchsen mit im Mittel 18,0, 15,7 und 21,1 deutlich mehr PS den Griffel als bei den anderen vier Genotypen. Der mittlere Anteil in die Samenanlagen penetrierter PS war mit 1,1 – 16% sehr gering, lag aber noch über dem der anderen *C. persicum*-Genotypen. In allen bestäubten Blüten waren PS bis in den Placentabereich durchgewachsen.

Die mittlere Anzahl PS im Griffel war bei interspezifischen Kombinationen zwischen *C. persicum* x *C. purpurascens* und *C. persicum* x *C. hederifolium* deutlich höher als bei Verwendung der Wildarten als mütterlicher Partner (Tab. 2). Werte von 2,1 PS wurden hier nicht überschritten. Während in den Kombinationen *C. persicum* cv. x *C. purpurascens* und *C. persicum* cv. x *C. hederifolium* in allen bestäubten Blüten PS bis in den Placentabereich gelangten, fehlten diese in reziproker Kombination vollständig. In den Kreuzungskombinationen *C. persicum* cv. x *C. hederifolium* (CP x Ch) durchwuchsen im Mittel mehr PS den Griffel und penetrierten in die Samenanlagen (Tab. 2 und Abb. 1B), als in den Kombinationen *C. persicum* cv. x *C. purpurascens* (CP x Cp). Das PSW in den intraspezifischen Kombinationen Ch x Ch und Cp x Cp war auffallend schlecht.

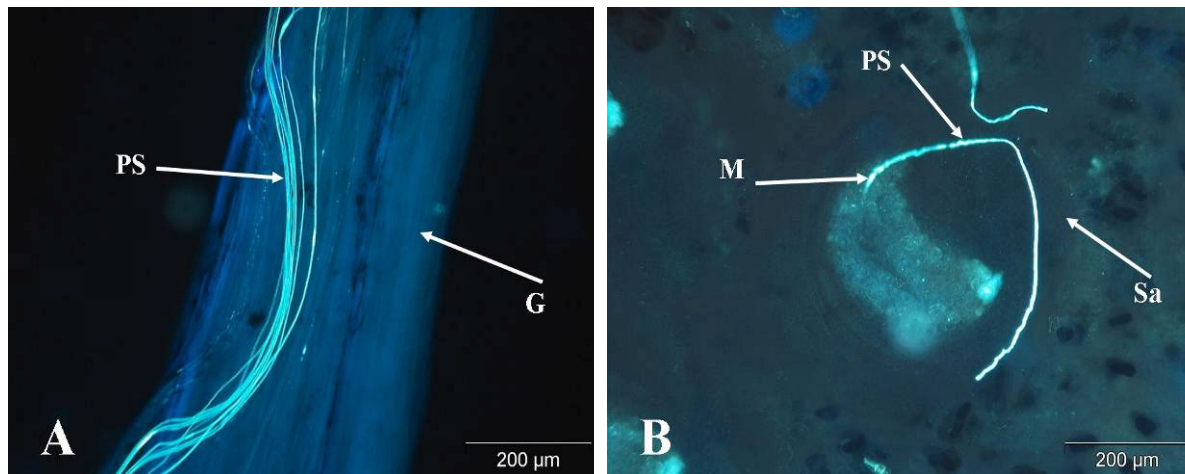


Abb. 1. Pollenschläuche im Griffel (A), Penetration eines Pollenschlauchs in die Samenanlage (B) 14 Tage nach der Bestäubung, PS = Pollenschlauch, G = Griffel, M = Mikropyle, Sa = Samenanlage.

Tabelle 2. Vergleich der mittleren Anzahl Pollenschläuche im Griffel (PS Griffel) und des mittleren Anteils in die Samenanlagen penetrierende Pollenschläuche (% PS Samenanlagen) der Kreuzungseltern in intra- und interspezifischen Kreuzungskombinationen 14 Tage nach der Bestäubung, CP = *C. persicum* cv., Ch = *C. hederifolium*, Cp = *C. purpurascens*, n=15

| Genotyp | Kreuzungskombination | PS Griffel | PS Samenanlagen |
|-------------------------|----------------------|------------|-----------------|
| CP cv. 'Miracle Purple' | CP x CP | 18,0 | 1,5 |
| CP cv. 'Sierra Scarlet' | CP x CP | 15,7 | 1,1 |
| CP cv. 'Sierra Rose' | CP x CP | 21,1 | 1,6 |
| CP cv. 'Halios' magenta | CP x CP | 8,1 | 0,4 |
| CP cv. 'Halios' rot | CP x CP | 10,0 | 0,7 |
| CP cv. 'No Name' rot | CP x CP | 9,5 | 0,6 |
| CP cv. 'Maxora' rot | CP x CP | 7,5 | 0,4 |
| CP cv. 'Miracle Purple' | CP x Ch; reziprok | 26,4; 1,7 | 2,8; 0,0 |
| CP cv. 'Sierra Scarlet' | CP x Ch; reziprok | 25,6; 1,7 | 2,2; 0,0 |
| CP cv. 'Sierra Rose' | CP x Ch; reziprok | 27,1; 2,1 | 3,5; 0,0 |
| CP cv. 'Halios' magenta | CP x Cp; reziprok | 12,6; 1,0 | 0,9; 0,0 |
| CP cv. 'Halios' rot | CP x Cp; reziprok | 17,8; 1,1 | 1,6; 0,0 |
| CP cv. 'No Name' rot | CP x Cp; reziprok | 19,5; 1,3 | 1,5; 0,0 |
| CP cv. 'Maxora' rot | CP x Cp; reziprok | 16,6; 0,9 | 1,0; 0,0 |
| <i>C. hederifolium</i> | Ch x Ch | 2,0 | 0,0 |
| <i>C. purpurascens</i> | Cp x Cp | 1,8 | 0,0 |

Bei allen Kreuzungskombinationen mit Pflanzen auf amphiploidem Niveau konnte PSW im Griffel beobachtet werden, aber im Gegensatz zu Kombinationen auf amphidiploidem

Niveau keine in die Samenanlagen penetrierenden PS (Tab. 3). In den Kombinationen AD x AP (Hybridgruppen A, C, F und G) und reziprok war nur eine geringe mittlere Anzahl PS im Griffel vorhanden, zudem war der Anteil Blüten mit PS im Placentabereich null. Amphiploide als mütterliche Partner mit den Kreuzungseltern (AP x Ch/Cp, AP x CP) zeigten eine relativ hohe Anzahl PS im Griffel und PS im Placentabereich aber keine in die Samenanlagen penetrierten PS (Tab. 3). Das beste PSW war in den Kombinationen AD x Ch mit im Mittel 47,27 und 40,93 PS im Griffel und 1,8 bzw. 1,95% penetrierenden PS und bei AD x Cp mit 1,13 und 1,35% penetrierenden PS zu beobachten. Rückkreuzungen mit *C. persicum* als Kreuzungspartner wiesen in allen Hybridgruppen nur in amphidiploiden Kombinationen in die Samenanlagen penetrierende PS auf. Wurden *C. purpurascens* oder *C. hederifolium* als mütterlicher Partner gewählt, war das PSW sowohl auf amphiploidem als auch auf amphidploidem Niveau deutlich schlechter.

Tabelle 3. Vergleich der mittleren Anzahl Pollenschläuche im Griffel (PS Griffel), Anteil Blüten mit PS im Placentabereich (% B PS) und des mittleren Anteils in die Samenanlagen penetrierter Pollenschläuche (% PS Samenanlgen) interspezifischer Hybriden in intra- und interspezifischer Kreuzungskombination 14 Tage nach der Bestäubung am Beispiel von vier Hybridgruppen (CP = *C. persicum* cv., Ch = *C. hederifolium*, Cp = *C. purpurascens*, AP = amphiploid, AD = amphidiploid), n=15

| Kreuzungs- kombination | Gruppe A | | | Gruppe C | | | Gruppe F | | | Gruppe G | | |
|---------------------------|---------------|---------------|-------------------------|---------------|---------------|-------------------------|--------------|---------------|-------------------------|---------------|---------------|-------------------------|
| | PS Griffel | B PS | PS Samen- anlagen | PS Griffel | B PS | PS Samen- anlagen | PS Griffe | B PS | PS Samen- anlagen | PS Griffel | B PS | PS Samen- anlagen |
| AP x AP | 3,53 | 0,00 | 0,00 | 2,67 | 0,00 | 0,00 | 3,80 | 0,00 | 0,00 | 3,67 | 0,00 | 0,00 |
| AP x AD | 6,53 | 0,00 | 0,00 | 7,20 | 0,00 | 0,00 | 6,47 | 0,00 | 0,00 | 3,27 | 0,00 | 0,00 |
| AD x AD | 15,73 | 100,00 | 1,01 | 16,13 | 100,00 | 1,50 | 15,47 | 100,00 | 0,95 | 15,73 | 100,00 | 0,93 |
| AD x AP | 4,13 | 0,00 | 0,00 | 4,40 | 0,00 | 0,00 | 3,47 | 0,00 | 0,00 | 3,60 | 0,00 | 0,00 |
| AP x Ch/Cp | 19,73 | 80,00 | 0,00 | 15,53 | 86,67 | 0,00 | 11,27 | 63,62 | 0,00 | 12,20 | 66,67 | 0,00 |
| AD x Ch/Cp | 47,27 | 100,00 | 1,80 | 40,93 | 100,00 | 1,95 | 28,60 | 100,00 | 1,31 | 29,13 | 100,00 | 1,35 |
| Ch/Cp x AP | 2,13 | 0,00 | 0,00 | 2,87 | 0,00 | 0,00 | 2,33 | 0,00 | 0,00 | 2,60 | 0,00 | 0,00 |
| Ch/Cp x AD | 2,67 | 0,00 | 0,00 | 2,07 | 0,00 | 0,00 | 2,00 | 0,00 | 0,00 | 2,27 | 0,00 | 0,00 |
| AP x CP | 15,87 | 82,00 | 0,00 | 12,93 | 84,00 | 0,00 | 9,87 | 60,33 | 0,00 | 9,27 | 62,67 | 0,00 |
| AD x CP | 21,47 | 100,00 | 0,47 | 20,80 | 100,00 | 0,54 | 15,27 | 100,00 | 0,36 | 15,60 | 100,00 | 0,38 |
| CP x AP | 4,53 | 0,00 | 0,00 | 5,93 | 0,00 | 0,00 | 4,27 | 0,00 | 0,00 | 4,40 | 0,00 | 0,00 |
| CP x AD | 14,00 | 100,00 | 1,11 | 14,67 | 100,00 | 1,26 | 14,00 | 100,00 | 0,80 | 13,87 | 10,00 | 0,84 |

3.4.3 Samenbildung

Ab der dritten Woche nach der Bestäubung begannen in den Kreuzungskombinationen mit amphiploiden Partnern (AP x AP, AP x AD und AD x AP) die Blüten zu abortieren. Nach sechs Wochen waren es 100%. Dagegen überlebten bei den vier Hybridgruppen alle bestäubten Blüten aus den Kreuzungskombinationen amphidiploid x amphidiploid. In den Samenanlagen wurde Endospermbildung (3C+6C - Zellkerne) nachgewiesen (Abb. 2 und 3). Die Embryobildung konnte nicht bewertet werden, da Integumente und Embryo den gleichen Ploidiegrad (2C + 4C - Zellkerne) haben und somit in den Histogrammen die gleiche Peakposition, während die Endospermzellen sehr gut abgrenzbar sind. Durch Endoreduplikation bedingt höherploide Zellkerne konnten nicht beobachtet werden.

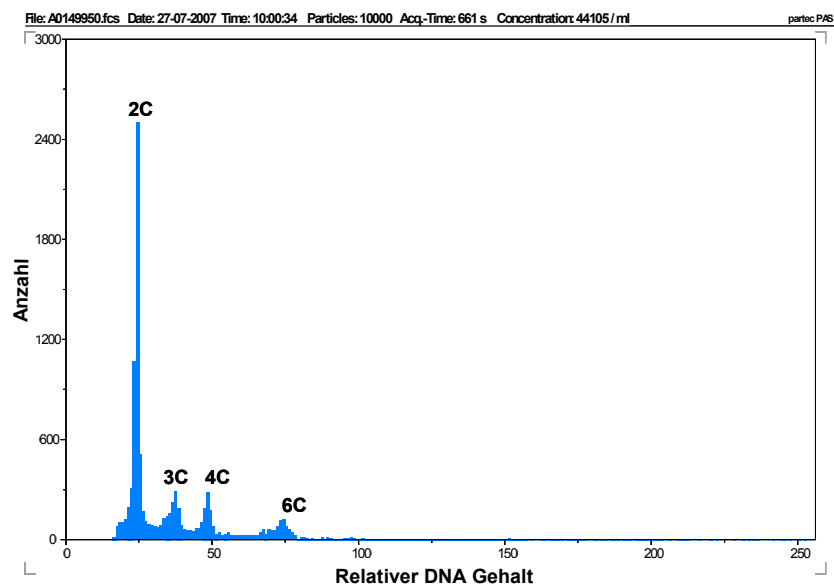


Abb. 2. DNA-Histogramm von Samenanlagen aus einer Kombination AD x AD, sechs Wochen nach der Bestäubung mit deutlicher Endospermdifferenzierung, 2C, 4C = Embryo/Integumente, 3C, 6C = Endosperm, AD = amphidiploid

Der 6C/3C- Index war über alle Abnahmezeitpunkte in den Hybridgruppen mit *C. hederifolium* als väterlicher Partner (A, C) am geringsten. Das bedeutet, dass hier die Gewebedifferenzierung und somit die Samenbildung rascher vonstatten ging, als in Kombinationen mit *C. purpurascens*. (Hybridgruppen F und G). Die Datenanalyse mittels

ANOVA und folgendem Tukey HSD-Test ($\alpha = 0,05$) zeigte signifikante Unterschiede zwischen Gruppe C und den Gruppen F und G. Ebenso unterschieden sich der C6/C3-Mitoseindex zwischen den Gruppen A und F sowie A und G signifikant. Die Gruppen A und C sowie F und G waren nicht signifikant verschieden (Abb. 3). Das C6/C3-Verhältnis sank bis zur 8. Woche nach der Bestäubung kontinuierlich ab. Das Endosperm bestand überwiegend aus triploiden Zellen. Der Entwicklungsstand der Gruppen F und G in der 8. Woche entsprach dem der Gruppen A und C in der 6. Woche. Die Differenzierung verlangsamte sich bei den Gruppen A und C im Vergleich zu F und G bis zur 8. Woche deutlich.

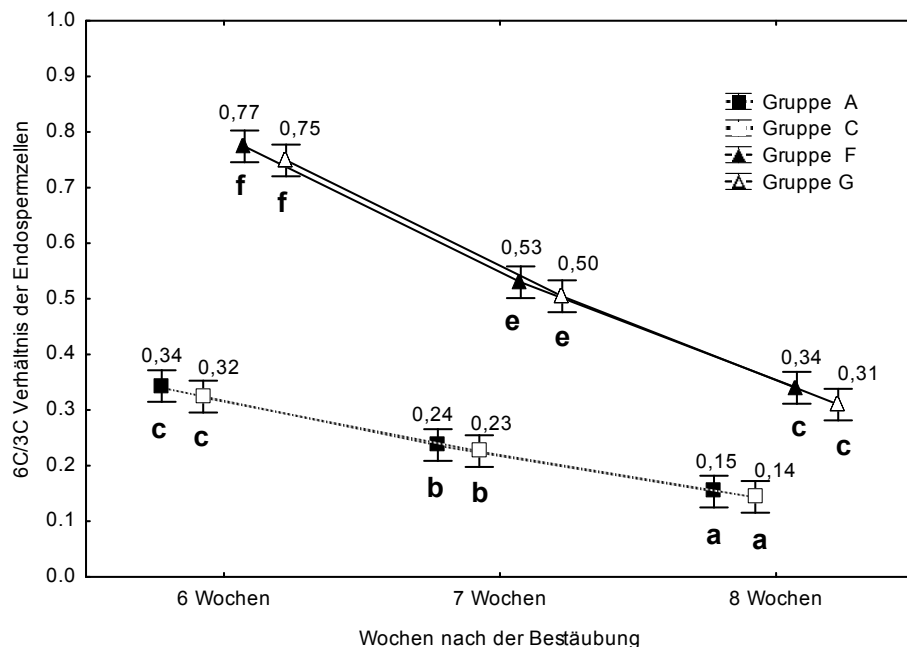


Abb. 3. Vergleich des Verhältnisses von hexa- zu triploiden Endospermzellen (6C/3C) bei den amphidiploiden Kreuzungskombinationen (AD x AD) sechs bis acht Wochen nach der Bestäubung ausgewählter interspezifischer Hybridgruppen (A, C, F und G); Die Varianzanalyse ergab einen signifikanten Effekt: $F(6, 60) = 26,163$, $p = 0,000$; (Werte mit unterschiedlichen Buchstaben, sind bei $p \leq 0,05$ signifikant voneinander verschieden).

3.5 Diskussion

Neue interspezifische Hybriden sind in der Pflanzenzüchtung eine wichtige Quelle zur Erweiterung der genetischen Basis. Nur mit effizienten Vermehrungsverfahren können diese Eingang in die gärtnerische Praxis finden. Interspezifische Cyclamen-Hybriden lassen sich z. T. sehr gut in vitro vermehren (Ewald et al., 2000). Sie sind jedoch nur eingeschränkt über Samen vermehrbar (Ishizaka, 1996, 1998; Ishizaka und Uematsu, 1990, 1992, 1995a; Ewald, 1996).

Amphidiploiden kommt nach Ishizaka (2008), eine wichtige Rolle bei der Züchtung neuer Cyclamen zu, da sie eine hohe Eignung zur Kombination mit diploiden und autotetraploiden Sorten von *C. persicum* haben und zudem resistent gegenüber der Cyclamenwelke (Erreger *Fusarium axsporum* f. sp. *cyclaminis*), *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* und der Blattwelke (*Erwinia herbicola* pv. *cyclamenae*) sind.

Die durchgeführten Untersuchungen dienten neben dem Erkenntnisgewinn zur Befruchtungsbiologie und Samenbildung von interspezifischen Hybriden dem Screening verschiedener Kreuzungskombinationen hinsichtlich ihrer Voraussetzungen für die generative Vermehrbarkeit. Gegenübergestellt wurden Samenanlagenzahl, Quantität des PSW und die Endospermdifferenzierung während der Samenbildung. Da die geprüften interspezifischen Hybriden zeitgleich entstanden waren und unter identischen Bedingungen kultiviert wurden, waren gute Voraussetzungen für eine Vergleichbarkeit gegeben.

Die mittlere Anzahl Samenanlagen, als eine Grundvoraussetzung für hohe Samenzahlen, der Untersuchungsobjekte war genotypabhängig. Ein Einfluss des Kreuzungspartners auf die Samenanlagenzahl der Hybriden ist nicht erkennbar. Untersuchungen zum PSW sind eine wichtige Methode, um die Kompatibilität zwischen verschiedenen Kreuzungspartnern festzustellen (Kho und Baër, 1968). In der vorliegenden Studie wurde beobachtet, dass die Quantität des Pollenschlauchwachstums von Genotyp, Kreuzungskombination und Ploidiegrad bestimmt wird. Zwischen Samenanlagenzahl und Quantität des PSW bestand offenbar kein Zusammenhang. Die Geschwindigkeit des PSW ist artspezifisch, wobei aber auch innerhalb einer Art Differenzen auftreten können (Odenbach, 1997). Auch bei den intraspezifischen *C. persicum* Kombinationen zeigten sich Unterschiede in der Anzahl PS im Griffel.

Die Untersuchungen zeigten deutlich, dass nur Kombinationen mit amphidiploiden Hybriden die Voraussetzungen für eine Samenvermehrbarkeit haben. Bei Verwendung amphiploider Partner erreichten keine PS die Samenanlagen. Die sehr geringe Anzahl PS im Griffel ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf deren geringe Pollenvitalität zurückzuführen (Ishizaka und Uemastu, 1994, 1995b; Ewald et al., 2000; Ishizaka, 2008). Rückkreuzungen von amphidiploiden Hybriden mit den Kreuzungseltern *C. persicum*, *C. hederifolium* und *C. purpurascens* sind offenbar ebenfalls möglich, da nach den Bestäubungen PS in die Micropylen der Samenanlagen einwuchsen. Die eigentliche Befruchtung konnte nicht beobachtet werden. Kombinationen mit *C. hederifolium* als mütterlicher Kreuzungspartner erscheinen Erfolg versprechender zu sein, als mit *C. purpurascens*. Interessant ist, dass beide Wildarten sowohl in intraspezifischer Kombination als auch als mütterliche Partner nur eine geringe Anzahl PS bilden.

Die Ursachen können in einer hohen Sensibilität auf die vorangegangene Kastration, (Ishizaka (2008), eine zum Bestäubungszeitpunkt geringe Narbenrezeptivität oder in der noch fehlenden Empfängnisbereitschaft der Samenanlagen zu suchen sein. Das sollen zukünftigen Analysen klären. Vielfach wird berichtet, dass der Obturator bzw. die Mikropyle vor allem protein- und kohlenhydrathaltige Substanzen und Exsudate absondert, die die Pollenschläuche zum Einwachsen animieren sollen, so u. a. bei *Pseudotsuga menziesii* (Aderkas und Leary, 1998), *Prunus persica* (Herrero, 2001).

Die Produktion des Exsudates kann von der Präsenz eines funktionierenden Megagametophyten oder Embryosacks abhängen (Fortescue und Turner, 2005). Zudem wird vielfach Calloseeinlagerung in Verbindung mit der Sterilität der Samenanlagen beschrieben, z. B. bei *Medicago sativa* (Rosellini et al., 1998, 2003; Kolyasnikova, 1985) sowie anderen *Medicago*-Arten (Oryol et al., 1986). Samenanlagen mit Calloseeinlagerung gelten demnach als steril und nicht funktionell (Knox et al., 1986) sowie als lebensunfähig (Dumas und Knox, 1983). Es kann davon ausgegangen werden, dass bei amphiploiden die Funktionsfähigkeit der Samenanlagen ebenfalls eingeschränkt ist und somit der Anreiz für das PSW zusätzlich gering ist. Zhao und Sun (2009) berichten, dass niedriger Samenansatz in *M. coriacea* durch eine Kombination von Faktoren wie Anomalien der Pollen und Samenanlagen, fehlende Bestäuber und Inzuchtdepression bedingt wurde.

Die Flowcytometrie ist eine gute Methode, um die Gewebedifferenzierung während der Samenbildung zu analysieren (Bergounioux et al., 1992; Bergervoet et al., 1996; Sliwinska et al., 1999; Sliwinska, 2000, 2009; Heenan et al., 2002).

Die Mitoseaktivität während der Endosperm Bildung und der Anteil Endospermzellen gelten bei einigen Kulturen als guter Marker und liefern somit aussagekräftige Rückschlüsse für den Entwicklungszustand der Samen (Sliwinska, 2000, 2009; Kastner und Pank, 2006).

In der vorliegenden Studie zeigten nur amphidiploide Hybriden Endosperm Bildung. Bei amphiploiden Hybriden deuten die Ergebnisse zum PSW sowie der 100%ige Abort der Blüten nach deren Bestäubung darauf hin, dass es nicht zur Befruchtung gekommen ist. Die Wahl der amphidiploiden Kreuzungspartner hatte einen starken Einfluss auf die Differenzierungsrate des Endosperms (Verhältnis der Endospermzellen - 6C/3C). Der 6C/3C-Index bei *C. persicum* cv. x *C. hederifolium*-Hybriden ist wesentlich niedriger als bei *C. persicum* cv. x *C. purpurascens*-Hybriden. Das bedeutet, dass die Samenbildung bei ersteren schneller abläuft (Einen weiteren Hinweis auf eine Beziehung zwischen zügigerer Samenbildung und Anzahl Samen liefern die Ergebnisse aus Kapitel 5.4.4.). Es ist zu vermuten, dass amphidiploide *C. persicum* cv. x *C. hederifolium*-Hybriden, bedingt durch die Ergebnisse zur Samenanlagenzahl und zum PSW, in der Lage sind, mehr Samen zu bilden.

Da die In-vitro-Vermehrung häufig zeit- und kostenintensiv ist, muß für eine erfolgreiche Einführung der Hybriden in die gärtnerische Praxis Saatgut in ausreichender Menge gesichert werden. Daher müssen Kenntnisse zur Kultivierung dieser neuen Hybriden gewonnen werden.

Kapitel 4



Samenträger von *C. persicum* nach *P. indica* Inokulation

4 Wurzelbesiedelung mit *Piriformospora indica* fördert bei optimalem Phosphorangebot die Mikrosporogenese sowie die Pollen- und Samenanlagenqualität bei *Cyclamen persicum*

4.1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit prüft bei *Cyclamen persicum* cv. die Auswirkungen der Besiedelung der Wurzeln durch den symbiontischen Pilz *Piriformospora indica* (Piri) in Kombination mit einem differenzierten Phosphor-Angebot. Bei der Sorte 'Melody' wurde der Einfluss auf generative Merkmale wie Mikrosporogenese sowie Vitalität von Pollen und Samenanlagen in vier Kombinationen untersucht: Phosphor-Optimal mit Piri, Phosphor-Optimal ohne Piri, Phosphor-Mangel mit Piri, Phosphor-Mangel ohne Piri.

Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl die Phosphorernährung als auch Piri die Entwicklung generativer Merkmale deutlich beeinflussten. Zudem wurde die Reaktion der Pflanzen verbessert, wenn beide Faktoren in der Kombination (Phosphor-Optimal mit Piri-Besiedelung) zur Wirkung kamen. So erhöhte Piri-Inokulation die Phosphor-Aufnahme im oberen Optimalbereich ($> 3,7 \text{ mg P / g TM}$) weiter signifikant um 11,2%. Die Blüten entwickelten dabei die höchsten Anteile homogener Mikrosporen sowie die höchste Vitalität von Pollenkörnern und Samenanlagen, wenn bei optimaler Phosphor-Düngung gleichzeitig eine Piri-Inokulation erfolgte. Dagegen wurden die niedrigsten Werte beobachtet, wenn bei mangelnder Phosphor-Düngung keine Piri-Inokulation stattgefunden hatte. Die Piri-Inokulation erhöhte die Vitalität der Pollen und Samenanlagen bei beiden Phosphor-Angeboten jedoch insbesondere durch eine verbesserte Phosphat-Versorgung. Ohne Piri-Inokulation reduzierte sich die Vitalität bei gleichem Phosphor-Angebot. Das Phosphorangebot erwies sich als dominierender Faktor. So entwickelten sich bei optimaler Phosphor-Düngung der Pflanzen im Mittel mehr homogene Mikrosporen sowie mehr vitale Pollen und Samenanlagen als bei Phosphor-Mangel.

4.2 Einleitung

Viele Studien zeigen, dass Umweltbedingungen wie Herbivorie, Bodenfruchtbarkeit und Mykorrhiza-Infektionen durch Veränderungen der Blütenanzahl und / oder Pollenanzahl pro Blüte Auswirkungen auf die Pollen-Produktion einer Pflanze haben (z. B. Lau et al., 1995; Poulton et al., 2001b).

Neben Stickstoff und Kalium spielt Phosphor eine große Rolle bei diesen Vorgängen. Viele Publikationen berichteten über die Bedeutung des Phosphors für Pflanzen. Phosphor ist wichtigster Energieträger und hat u. a. Einfluss auf den Knospenansatz, die Blütenanzahl, die Größe des Pollenkornes und die Samenbildung. Poulton et al. (2002) zeigten bei Tomaten, dass Phosphor Auswirkungen auf den Blütenansatz, die Fruchtmasse, die Samenanzahl und die Pollenanzahl pro Pflanze sowie die mittlere Pollenproduktion pro Blüte hat. Zudem wird für *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) berichtet, dass auch die Größe des Pollens und seine chemische Zusammensetzung beeinflusst werden (Lau und Stephenson, 1994).

Die überwiegende Zahl der Pflanzenarten profitiert von einer symbiontischen Pilz-Besiedelung durch die verbesserte Nährstoffverfügbarkeit. Insbesondere gilt dies für den Phosphattransport an die Wurzel. Hayman (1983), Smith und Gianinazzi-Pearson (1988) und Li et al. (1991) berichteten, dass arbuskuläre Mykorrhizapilze eine besondere Fähigkeit zur Verbesserung der Phosphor (P)-Ernährung der Pflanzen haben. Zudem wurden andere endophytische Pilze identifiziert, die zur Förderung des Pflanzenwachstums beitragen können. Zu ihnen gehört der Pilz *Piriformospora indica* (Sebacinales) (Weiss et al., 2004). Der Einsatz von *P. indica* führte zur Verbesserung des Wachstums und der Gesundheit der Pflanzen (Singh et al., 2000). Ergänzend zur Wachstums- und Biomasseförderung, wurden eine frühere Blüte und höherer Ertrag beobachtet (Rai et al., 2001; Barazani et al., 2005; Waller et al., 2005). Zudem erhöhte eine Besiedelung mit *Piriformospora indica* (*P. indica*) in Gerste auch die Toleranz gegenüber leichtem Salzstress und förderte die Resistenz gegenüber Wurzel- und Blattpathogenen. (Waller et al., 2005; Serfling et al., 2007; Deshmukh und Kogel, 2007; Baltruschat et al., 2008).

Auf der Grundlage dieser unterschiedlichen, physiologischen Wirkungen von *P. indica*, die den Auswirkungen arbuskulärer Mykorrhizapilze ähnlich sind, wird vermutet, dass eine

Inokulation der Wurzeln mit dem Endophyten (*Piriformospora indica*) auch wichtige befruchtungsbiologische Parameter wie die Vitalität der Pollen und Samenanlagen sowie die Mikrosporogenese beeinflussen kann. Das sollte am Beispiel von *Cyclamen persicum* 'Melody' in Kombination mit einem differenzierten P-Angebot geklärt werden.

4.3 Material und Methoden

4.3.1 Pflanzenmaterial und Düngung

Jungpflanzen von *C. persicum* 'Melody' white (Fa. VARINOVA, NL) wurden in Kalenderwoche 28 im 5-Blattstadium in 12er Töpfe mit je 700 ml Substrat getopft (1 Pflanze je Topf). Als Substrat wurde Weißtorf (Letta Flor, S.I.A. Nordtorf) verwendet. Im Ergebnis von Vorversuchen (Kalkungsreihe) wurde der Kalkbedarf ermittelt und ein pH-Wert von 6,3 durch Beimischung von 6,15 g CaCO_3 pro Liter Torf-Substrat eingestellt (Röber und Schaller 1985). Außerdem wurden dem Torf zu Versuchsbeginn 30% des Angebots der übrigen Nährstoffe (N, P, K, Mg und Mikronährstoffe) in gelöster Form als Grunddüngung zugemischt. Die verbleibenden 70% dienten der flüssigen Nachdüngung an 12 Terminen (Fischer und Anneser 2003). Die Phosphorversorgung war ein Prüffaktor und wurde in den Abstufungen Phosphor-Optimal und Phosphor-Mangel als $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ gedüngt (Gesamtangebot siehe Prüfvarianten A, B, C, D - davon 30% Grunddüngung als $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$: P-Optimal 129 mg/Topf, P-Mangel 16 mg/Topf). Die flüssige Nachdüngung begann drei Wochen nach dem Topfen. In 100 ml Nährlösung wurden je Pflanze und Woche bei optimaler Phosphor-Düngung 25 mg $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ und bei P-Mangel 3 mg $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ dosiert. Im übrigen erhielten alle Pflanzen in der gleichen Nährlösung ein optimales Nährstoffangebot aus dem phosphatfreien Mehrnährstoffdünger Flory8 (20%N, 0% P_2O_5 , 16% K_2O , 1,5%MgO, 0,02%B, 0,03%Cu, 0,075%Fe, 0,050Mn, 0,001%Mo, 0,01%Zn; EUFLOR GmbH, München).

Die applizierte Düngermenge des Flory 8 ergab sich aus der optimalen Stickstoffdosis (390 mg N/Pfl; davon 30% zur Grunddüngung = 130 mg N/Topf = 585 mg Flory 8/Topf). Zur optimalen Kaliumversorgung waren insgesamt 610 mg K_2O /Pfl vorgesehen. Jedoch

war die Kaliummenge des Flory8 mit 312 mg K_2O /Pfl unzureichend und wurde daher um 298 mg K_2O /Topf als K_2SO_4 ergänzt. Von den benötigten 610 mg K_2O /Pfl wurden 30% als Grunddüngung = 203 mg K_2O /Topf verabreicht. Entsprechend der flüssigen Nachdüngung wurden je Pflanze und Woche 114 mg Flory8 sowie 32 mg K_2SO_4 appliziert. In diesen Nährlösungen summierten sich die Düngermengen aus $Ca(H_2PO_4)_2$; Flory8 und K_2SO_4 bei Phosphor-Optimal auf 1,71 g/l und bei Phosphor-Mangel auf 1,49 g/l. Zur genauen Terminierung der flüssigen Nachdüngung wurde der aktuelle Nährstoffstatus im Substrat nach Zerche et al. (2008) 14- tällig gemessen (Substratgehalte in mg / l Torf-Substrat: P-Optimal 223 NO_3-N , 337 K; P-Mangel: 298 NO_3-N , 431 K; Messtermine N=11 bei 302 Kulturtagen). In den Prüfvarianten mit Phosphor-Mangel wurde nach Zufuhr der gesamten P-Menge (32 mg P_2O_5 /Pflanze) die flüssige Nachdüngung von N und K im Vergleich zu den optimalen Phosphor-Varianten zeitweise reduziert oder eingestellt, da die P-Limitierung neben dem Wachstum auch die N- und K-Aufnahme reduzierte und so die N- und K-Vorräte im Substrat etwas anstiegen. In Variante Phosphor-Optimal erfolgte wegen der hohen N-Aufnahme während der Entwicklung der Samenkapseln eine zusätzliche N-Düngung von 101 mg $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ je Topf mit 100 ml Nährlösung. Das Ceteris paribus Prinzip (Gleichbehandlung aller Varianten) wurde gewahrt, indem die Varianten mit Phosphor-Mangel gleichzeitig 100 ml Wasser je Topf bekamen. Um Nährstoffverluste mit dem Drain zu verhindern, hatte jeder Topf einen eigenen Untersetzer. Die Pflanzen wurden bei 18 – 25 °C im Gewächshaus kultiviert und nach Bedarf zusätzlich mit Wasser gegossen. Blühbeginn war in der 35. Kalenderwoche.

4.3.1.1 Prüfvarianten

A. Pflanzen optimal mit Phosphor ernährt mit Piri-Inokulation (P+Piri+), 260 mg P_2O_5 /Pflanze für ein nicht limitiertes Wachstum.

B. Pflanzen optimal mit Phosphor ernährt ohne Piri-Inokulation (P+Piri-), 260 mg P_2O_5 /Pflanze

C. Pflanzen mit Phosphormangel mit Piri-Inokulation (P-Piri+), 32 mg P_2O_5 / Pflanze

D. Pflanzen mit Phosphormangel ohne Piri-Inokulation (P-Piri-), 32 mg P_2O_5 / Pflanze

Untersucht wurden 84 Pflanzen (7 Pflanzen/3 Wiederholungen/4 Varianten, gesamt = 84 Pflanzen).

4.3.2 Methoden

4.3.2.1 Inokulation mit dem Pilz *Piriformospora indica* und Nachweis der Wurzelbesiedelung

Der Pilz *Piriformospora indica* wurde in dankenswerter Weise durch Herrn Dr. Baltruschat (Universität Gießen, Germany) zur Verfügung gestellt. Die Kultur des Pilzes erfolgte in PDB-Medium in 250 ml Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler (100 U/Minute) bei 23 °C. Nach 14 Tagen wurde abfiltriert und das Mycel durch Abtupfen von überschüssigem Nährmedium befreit. Die Inokulation erfolgte mit 10 ml/Pflanze einer 0.1%igen Piri-Suspension (1g Frischmycel pro Liter Wasser) im 12-14 Blattstadium vier Wochen nach dem Pikieren.

7 Pflanzen/3 Wiederholungen/4 Varianten, gesamt = 84 Pflanzen. Der Nachweis des Pilzes erfolgte vier Wochen später mit Trypanblau 1% nach Phillips und Hayman (1970). Dafür wurden von den jungen weißen Wurzeln der Pflanzen je Probe zufällig 15 Stücke ausgewählt und gesammelt. Dazu wurden die Wurzeln einer Probe in ein Probengläschen überführt und mit 10 % KOH 18 Minuten im Wasserbad bei +90°C erhitzt. Anschließend wurden die Probengläschen aus dem Wasserbad entnommen und die KOH-Lösung gegen 5 %ige HCl-Lösung (154ml 32 %ige HCl/1000 ml A. dest.) ausgetauscht. Die Wurzeln

blieben für etwa 3 min in der Lösung und waren dabei nicht im Wasserbad. Anschließend wurde die HCl-Lösung entfernt, Färbelösung (1% Trypanblau) zu den Wurzelproben gegeben und nochmals 7 min im Wasserbad bei 95 °C erhitzt.

Nun wurde die Färbelösung entfernt, 96%iges Ethanol auf die gefärbten Wurzeln gegeben und nochmals im Wasserbad bei 95 °C für 2 min erhitzt (Ethanol entfernt die überschüssige Farbe und entlüftet gleichzeitig das Gewebe). Anschließend wurde das Ethanol gegen Lactolösung ausgetauscht (Lactolösung: Milchsäure, 87% Glycerin und A. dest im Verhältnis 1:2:1 mischen). Die Wurzeln von 25 Stücken wurden nun geschnitten, dann mit Milchsäure (90%) in Längsrichtung auf einen Objektträger aufgesetzt und mit Deckglas versehen. Die Untersuchung erfolgte mittels Durchlichtmikroskopie. Nach viermaligem Zählen (von oben nach unten) wurde der prozentuale Anteil der Wurzeln mit Piri-Besiedelung errechnet.

4.3.2.2 Pollenbildung

Von fünf Pflanzen je Wiederholung und Variante ($n = 5 \text{ Pflanzen} \times 3 \text{ Wiederholungen} \times 4 \text{ Varianten} = 60 \text{ Pflanzen}$) wurden jeweils 3-5 Blüten pro Pflanze analysiert und 150 Pollenmutterzellen (PMZ) ausgewertet. Für die Analyse der frühen Stadien der Pollenbildung wurden Blüten verwendet, deren Petalen ca. 1 mm sichtbar waren. Für die Tetradenanalyse hatten die Petalen eine Größe von ca. 3 mm. Die Antheren wurden in einem Gemisch aus Ethanol (90%ig) und Essigsäure (99%ig) im Verhältnis 3:1 für mind. 24 Stunden bei +4°C fixiert. Nach der Spülung in Aqua dest. erfolgte die Färbung mit 3,8%iger Karminsalzsäure für zwei Tage bei +4°C. Zur mikroskopischen Auswertung unter Durchlicht wurde zusätzlich mit 4%iger Karminessigsäure gefärbt.

4.3.2.3 Pollenvitalität

In die Untersuchungen zur Pollenvitalität (PV) wurden drei Proben je Wiederholung der vier Varianten ($n = 3 \text{ Proben} \times 3 \text{ Wiederholungen} \times 4 \text{ Varianten} = 36$) einbezogen. Die Proben wurden dreimalig im Abstand von zwei Monaten (Dezember, Februar und April) gewonnen. Es wurden Blüten im Stadium ca. ein bis drei Tage vor Anthese bis unmittelbar zu Anthesebeginn verwendet. Untersucht wurde ein Pollengemisch aus jeweils 9 bis 12 Blüten je Variante und Wiederholung. Der Nachweis der Esteraseaktivität erfolgte mittels FDA (Fluoreszeindiacetat) nach Kison und Franke (1980).

Zur Auswertung kamen jeweils 3-mal x 300 Pollenkörner je Pollenprobe. Dabei galten die intensiv grün-gelb fluoreszierenden Pollenkörnern als vital, nicht fluoreszierende als nicht vital.

4.3.2.4 Vitalität der Samenanlagen

Es wurden fünf Proben je Wiederholung der vier Varianten ($n = 5 \text{ Proben} \times 3 \text{ Wiederholungen} \times 4 \text{ Varianten} = 60$) bestehend aus drei Blüten je Probe analysiert. Die Fruchtknoten wurden einen Tag vor der Anthese isoliert, die Fruchtknotenhülle entfernt und für drei Stunden bei 35°C, bei Dunkelheit mit 1%iger TTC-Lösung (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid) behandelt. Rot gefärbte Samenanlagen wurden als vital eingestuft.

4.3.2.5 Mikroskopische Analysen

Die Analysen zur Pollenvitalität, Pollenbildung und Vitalität der Samenanlagen wurden mit einem Leitz-Mikroskop (DM RB) unter Auflichtfluoreszenz oder Durchlicht durchgeführt.

4.3.2.6 Phosphatuntersuchung

Die P-Konzentration im Spross (Blattproben) wurde an drei Terminen (Dezember, Februar, April) in ausgewählten Wachstumsstadien im Abstand von zwei bis drei Monaten je Wiederholung der vier Varianten untersucht. Zur Bestimmung der Phosphorkonzentration wurde nach Trocknung (48h bei 60°C) und Pulverisierung 250 mg Pflanzenmehl zum mikrowellengestützten Säureaufschluss (2 ml 65% HNO₃, µPREP-A Mikrowellen-System, MLS GmbH, Leutkirch, Germany, Lautenschläger and Kopp, 2000) verwendet. Die Aufschlusslösung wurde auf ein Endvolumen von 50 ml aufgefüllt und darin die P-Konzentration mit der Vanadat-Molybdat-Methode bei 440 nm am Spektralphotometer (V-550; Jasco Corp., Tokyo, Japan) gemessen (Zerche et al.2008). Die Phosphorgehalte wurden in mg pro Gramm Trockenmasse ermittelt.

4.3.2.7 Statistische Verfahren

Für die statistische Analyse der Daten wurde das Software-Paket Statistika 6.1 (STATSOFT, TULSA, USA) verwendet. Die Messdaten wurden varianzanalytisch mittels ANOVA/MANOVA ausgewertet. Der multivariate Zusammenhang zwischen prozentualen Anteilen der Tetraden, Triaden und Dyaden wurden mittels Wilks's Lambda untersucht und die Mittelwertdifferenzen mit Tukey HSD Test's bei $\alpha = 0,05$ auf Signifikanz geprüft.

4.4 Ergebnisse

4.4.1 Einfluss des P-Angebotes und der Piri-Besiedlung

Die P-Konzentration in den Blattproben wurde durch Piri-Applikation signifikant beeinflusst. Der höchste Wert wurde bei +P +Piri mit 4,20 mg P/g Trockenmasse (TM) gemessen. Im Prüfglied +P -Piri nahm die P-Konzentration um 0,47 auf 3,73 mg P/g TM signifikant ab. Bei mangelndem P-Angebot sank die P-Konzentration mit Piri-Besiedlung

(–P +Piri) deutlich bis auf 1,14 mg P/g TM ab und erreichte bei –P –Piri nur noch 1,08 mg P/g TM.

4.4.2 Intensität der Piri-Besiedlung der Cyclamenwurzeln

Der Besiedlungsgrad der Cyclamenwurzeln durch den Pilz wurde von der Phosphordüngung beeinflusst. So erreichte er in der Variante mit Phosphor-Mangel 36,7% und war damit der Variante mit normalem Phosphorangebot (22,7%) signifikant überlegen. Sporen und Hyphen des Piri-Pilzes waren unter Durchlicht deutlich erkennbar (Abb. 1). Bei allen Varianten, die nicht mit dem Pilz inokuliert wurden, war keine Besiedlung feststellbar (Besiedlungsgrad 0 %).

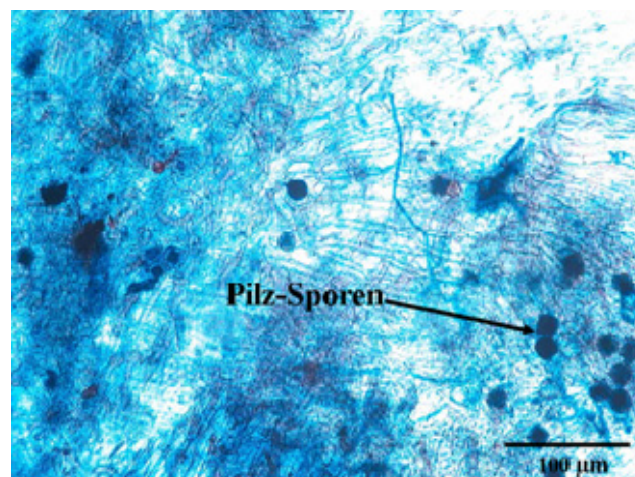


Abb. 1. Junge Pflanzenwurzeln vier Wochen nach der Inokulation mit *Piriformospora indica* nach Trypanblau-Färbung

4.4.3 Einfluss von Phosphorstatus und Piri-Inokulation auf die Mikrosporogenese

Ein Vergleich der prozentualen Anteile der Tetraden, Triaden und Dyaden im Tetradenstadium lässt einen Einfluss des Phosphorangebots und der Piri-Inokulation deutlich erkennen. So entwickelte sich in den Knospen der Pflanzen +P +Piri der höchste

Anteil Tetraden mit normalen Mikrosporen (vier optisch gleich große Mikrosporen) mit 94,9% und der niedrigste Anteil an Triaden mit anomalen Mikrosporen (eine große und zwei kleine Mikrosporen) mit 5,1%. Dyaden wurden nicht beobachtet (Abb. 2). Die Analyse der Daten mittels ANOVA, Tukey HSD test ($\alpha = 0,05$) zeigte, dass der Anteil der Tetraden in der Reihenfolge der Varianten: +P + Piri, +P - Piri, -P + Piri und -P - Piri von 94,9% über 90,3% und 75,5% bis auf 73,0% signifikant abnahm (Abb. 2). Ohne Piri-Inokulation war bei normalem Phosphor-Angebot eine signifikante Zunahme des Triadenanteils auf 9,7%, und bei weiter sinkendem Tetradenanteil in den P-Mangel-Varianten auf 23,1 bis 25,0% zu verzeichnen (Abb. 2).

Neben der Zunahme anomaler Triaden bewirkte ein P-Mangel auch, dass sich ein geringer aber signifikanter Anteil anomaler Dyaden (1,4 bis 2,0%) entwickelte, der von der Piri-Inokulation unbeeinflusst blieb (Abb. 2).

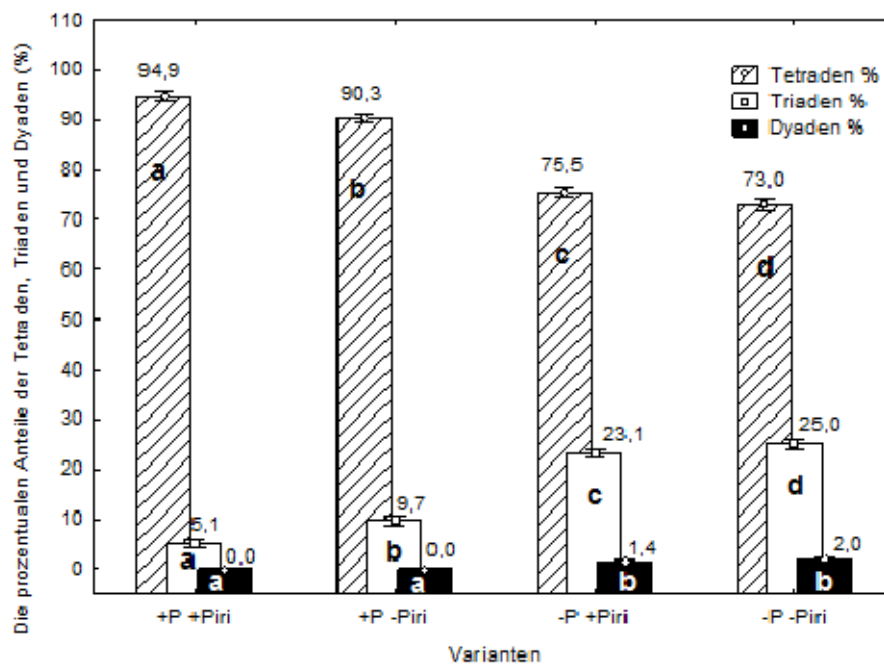


Abb. 2. Einfluss von Phosphorangebot und Piri-Inokulation auf die prozentualen Anteile der Tetraden, Triaden und Dyaden. Für den multivariaten Zusammenhang der Prüfmerkmale ergab Wilks' Lambda = 0,258 mit $F(6,110) = 95,790$, $p = 0,0000$. Verschiedene Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede bei $p \leq 0,05$ % für das jeweilige Merkmal

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich sowohl die Phosphordüngung als auch die Piri-Inokulation auf den Anteil der Tetraden, Triaden und Dyaden im Tetradenstadium auswirken. Weiterhin war Phosphor der Hauptfaktor für eine hohe Anzahl homogen ausgebildeter Pollenmutterzellen (PMZ) (Tetraden mit vier gleichen Mikrosporen) bei gleichzeitig wenigen anomalen PMZ mit drei Mikrosporen. Dyaden im Tetradenstadium traten bei der Variante Phosphor-Optimal nicht auf (Abb. 3A).

Im Vergleich dazu wurden bei der Variante Phosphor-Mangel zusätzlich zu den PMZ mit vier homogenen Mikrosporen auch Triaden und Dyaden beobachtet (Abb. 3B).

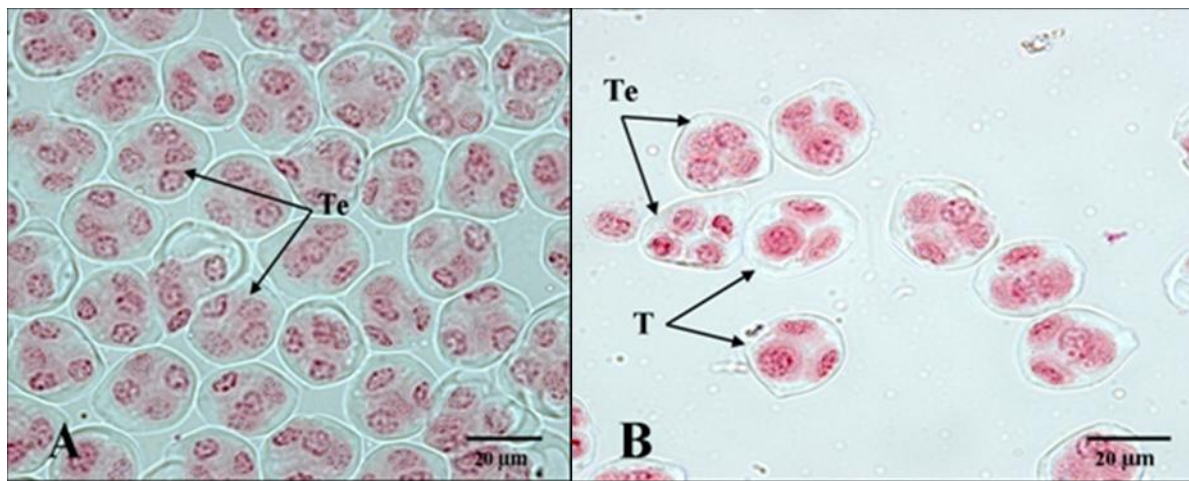


Abb. 3. PMZ im Tetradenstadium der Mikrosporogenese: (A) - Varianten-Phosphor-Optimal, PMZ mit vier homogenen Mikrosporen; (B) - Varianten-Phosphor-Mangel, PMZ mit Tetraden und Triaden, T = Triade, Te = Tetrade

4.4.4 Wechselwirkung von P-Angebot und Piri-Inokulation auf die Pollenvitalität

Die Analyse der Pollenvitalität (PV%) ergab einen signifikanten, aber relativ schwach ausgeprägten Wechselwirkungseffekt von Phosphor-Angebot und Piri-Inokulation (Abb. 4). Dieser basierte auf unterschiedlich starken Effekten der Hauptwirkungen. Dabei erwies sich das Phosphor-Angebot als dominierender Faktor. So entwickelten sich bei optimaler Phosphor-Düngung und im Mittel der Varianten mit Piri-Inokulation deutlich vitalere Pollen als bei P-Mangel (80,2% gegenüber 57,7%). Die Piri-Inokulation erhöhte die Pollenvitalität bei beiden Phosphor-Angeboten unterschiedlich. Die höchste Pollenvitalität

(PV%) wurde bei +P +Piri festgestellt und erreichte so 86,1% (Abb. 4). Bei +P -Piri reduzierte sich die PV% signifikant um 11,8% auf 74,3%.

Bei Phosphor-Mangel verringerte sich die PV% dagegen um weitere 14,9-18,2% auf 59,4% und 56,1%, wobei kein signifikanter Einfluss der Piri- Inokulation mehr vorhanden war. Der Entnahmetermin der Proben (Dezember, Februar und April) hatte keinen Einfluss.

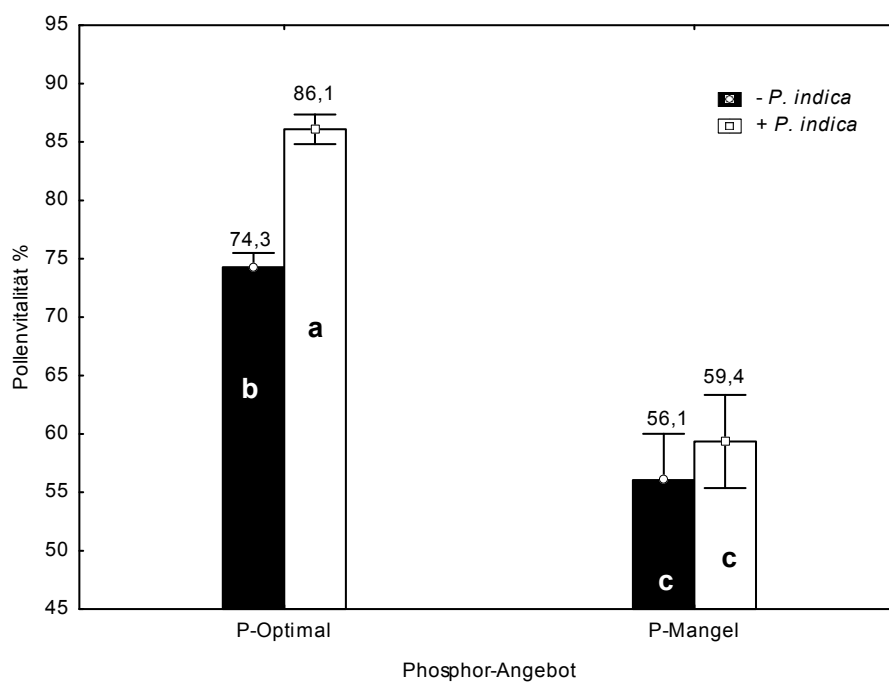


Abb. 4. Einfluss von Phosphor-Menge und Piri-Inokulation auf die Pollenvitalität. Die Varianzanalyse ergab einen signifikanten Effekt: $F(1, 32) = 11,113$, $p = 0,002$ (Werte mit unterschiedlichen Buchstaben sind bei $p \leq 0,05$ signifikant voneinander verschieden).

4.4.5 Einfluss von P-Angebot und Piri auf die Lebensfähigkeit der Samenanlagen

Die Ergebnisse belegen, dass eine hohe Lebensfähigkeit der Samenanlagen eine ausreichende Phosphordüngung verlangt, sich jedoch in Kombination mit einer Inokulation des endophytischen Pilzes *P. indica* (Piri) noch etwas verbessern lässt. So war der Einfluss des Phosphorangebotes mit Abstand am stärksten.

Durch die Daten-Analyse mittels ANOVA und einen folgenden Tukey HSD-Test ($\alpha = 0,05$) wurde nachgewiesen, dass zwischen allen geprüften Varianten signifikante Unterschiede bestehen (Abb. 5).

Den höchsten Anteil lebensfähiger Samenanlagen von 99,1% erreichte die Variante +P +Piri.

Mit einem kleinen aber signifikanten Unterschied folgte die Variante +P -Piri (96,7%).

Dagegen bildeten die Varianten mit P-Mangel deutlich geringere Anteile lebensfähiger Samenanlagen und erreichten in der Variante -P +Piri 89,8% und in der Variante -P -Piri 87,1% (Abb. 5). Bei optimaler P-Düngung und im Mittel der Piri-Varianten waren 97,9% der Samenanlagen lebensfähig. Im Unterschied dazu waren es bei Phosphormangel nur 88,4%. Nach einer Piri-Inokulation waren im Mittel der Phosphor-Varianten 94,4% der Samenanlagen lebensfähig, während es ohne Inokulation nur 91,9% der Samenanlagen waren. Die Ergebnisse zeigen die Signifikanz der Haupteffekte der beiden Einflussfaktoren, wobei keine Wechselwirkung vorhanden war (Abb. 5).

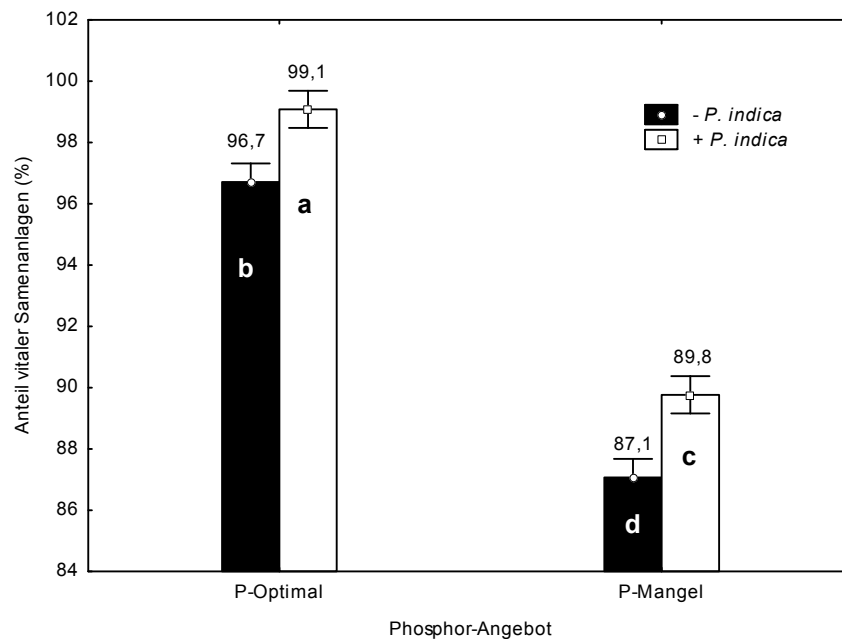


Abb. 5. Einfluss von Phosphor-Angebot und Piri-Inokulation auf den Anteil lebensfähiger Samenanlagen. Die Varianzanalyse ergab einen signifikanten Effekt: $F(1, 56) = 0,291$, $p = 0,591$ (Werte mit unterschiedlichen Buchstaben, sind bei $p \leq 0,05$ signifikant voneinander verschieden).

Abbildung 6 zeigt deutlich die Unterschiede zwischen vitalen und nicht vitalen Samenanlagen nach Tetrazoliumfärbung. Bei vitalen Samenanlagen ist insbesondere der Embryosack intensiv rot gefärbt. Nicht vitale Samenanlagen sind nicht gefärbt.

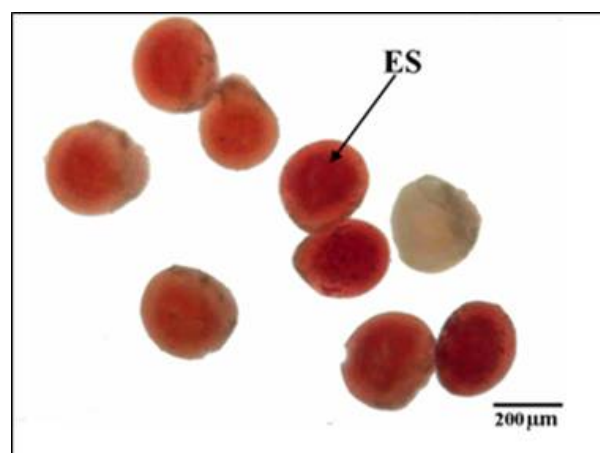


Abb. 6. Nachweis der Samenanlagenvitalität nach Tetrazolium-Färbung, Dunkelfeldmikroskopie, vitale Samenanlagen intensiv rot gefärbt, nicht vitale grauweiß, ES - Embryosack

4.5 Diskussion

Die Entwicklung von Pflanzen steht in Wechselwirkung von Genotyp und Umwelt. Die Ernährung der Samenträger ist eine wesentliche Einflussgröße der Umwelt. So spielt Phosphor neben Stickstoff und Kalium eine große Rolle bei vielen Vorgängen.

Es gibt zahlreiche Publikationen, die analog der eigenen Ergebnisse über einen Zusammenhang zwischen Phosphor-Angebot und reproduktiven Eigenschaften berichten. Als Merkmale, die auf die P-Düngung reagieren, wurden z.B. die Masse der Früchte, die Anzahl der Samen und Pollen pro Pflanze, die Pollenproduktion pro Blüte, die Größe eines Pollens und seine chemische Zusammensetzung identifiziert. So kann ein hohes Phosphorangebot bei Kürbis (*Cucurbita pepo*, Cucurbitaceae) (Lau und Stephenson, 1994; Lau et al., 1995) und Tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Poulton et al., 2001a) die Qualität der Pollen und die Pollenmenge fördern.

Die verbesserte Qualität führt zu einer höheren Fitness und verbesserten Funktion der männlichen Reproduktionsorgane. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen dies erstmals für Cyclamen. Wie vermutet, traten bei mangelnder Phosphorversorgung deutliche Effekte auf die Pollen- und Samenanlagenqualität zutage. Dabei erwies sich das Phosphorangebot als dominierender Faktor. Die Pollen und Samenanlagen zeigten bei optimaler P-Düngung der Pflanzen und im Mittel der Varianten deutlich vitalere Pollen und Samenanlagen als bei P-Mangel. Außerdem war der Anteil homogen ausgebildete Pollenmutterzellen (PMZ) positiv mit dem Phosphorangebot korreliert. Mit optimalem Phosphorangebot entwickelte sich ein höherer Anteil an Tetraden mit normalen Mikrosporen und ein niedrigerer Anteil an Triaden mit anomalen Mikrosporen.

In der gärtnerischen Praxis kann die Qualität der Pflanze nicht nur durch die Düngung, sondern auch durch andere Umweltfaktoren beeinflusst werden, wie z. b. durch Interaktionen mit Mikroorganismen. Für die Pflanze können sich diese Interaktionen sowohl positiv auf ihre Ernährung und Entwicklung, als auch auf ihre Resistenz bzw. Toleranz gegenüber biotischen und abiotischen Einflüssen auswirken (Azcón-Aguilar und Barea, 1996; Lekberg und Koide, 2005). Zu diesen Organismen gehören beispielsweise Mykorrhiza und *P. indica*. Eine wichtige und dramatische Auswirkung der Mykorrhiza-Kolonisation auf die Wirtspflanzen wird im Anstieg der Phosphoraufnahme ersichtlich

(Hayman, 1983; Smith und Gianinazzi-Pearson, 1988; Li et al, 1991; Koide, 1991; Harrison, 2005). Die verbesserte Aufnahme der Nährstoffe beruht in erster Linie auf der Fähigkeit der Mykorrhiza-Pilze, die Nährionen aus dem Boden zu absorbieren und sie in die Wurzeln der Wirtspflanzen zu transferieren (Asimi et al., 1980; George et al., 1995). Darüber hinaus zeigten zahlreiche Studien einen deutlichen positiven Einfluss der Mykorrhiza auf die reproduktiven Eigenschaften der Wirtspflanzen, die von einer verbesserten Phosphat-Versorgung aus der Symbiose profitieren. So haben Poulton et al. (2002) bei Tomaten festgestellt, dass Mykorrhiza-Kolonisierung in Kombination mit einer hohen Phosphorverfügbarkeit im Boden die Bedingungen für reproduktives Wachstum (Blütenproduktion insgesamt, Fruchtmasse, Samen- und Pollenproduktion pro Pflanze und mittlere Pollenproduktion pro Blüte) verbessern.

Eigene Ergebnisse zur Blütenproduktion, dem Blühzeitpunkt und dem Samenertrag werden in dieser Arbeit nicht dargestellt, Ergebnisse dazu, stehen aber im folgenden Artikel. Im Allgemeinen sind die Reaktionen von Wirtspflanzen auf Mykorrhiza-Inokulation und verbesserte Phosphorennährung stärker bei reproduktiven als bei vegetativen Merkmalen ausgeprägt. Dabei bestehen die sortentypischen Reaktionen in einer verbesserten Funktion der männlichen Reproduktionsorgane im Vergleich zu den weiblichen Poulton et al. (2002). Poulton et al. (2001a,b) zeigten bei *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae), dass Mykorrhiza-Kolonisation speziell bei hohem Phosphorangebot des Bodens zur Steigerung der Pollen-Qualität führt. Ähnliche Ergebnisse fanden Lau und Stephenson (1994) und Lau et al. (1995) bei *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae).

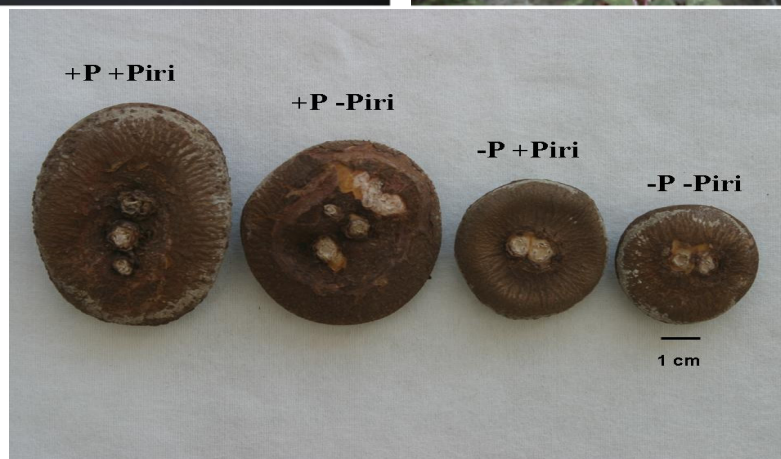
Für den Bodenzpilz *P. indica*, der phylogenetisch in der Nähe von Mykorrhiza-Endosymbionten von Orchideen und ericoiden Wurzeln einzuordnen ist, sind ähnliche Wirk-Effekte wie bei Mykorrhiza zu erwarten. Nachweislich fördert er das Wachstum verschiedener Pflanzenarten (Varma et al., 1999; Weiß et al., 2004). So diskutieren Pham et al. (2004), Shahollari et al. (2005) und Oelmüller et al. (2009) über einen positiven Effekt von *P. indica* durch verbesserte Phosphatzufuhr. *P. indica* erhöhte die Frischmasse der Wurzel, die Wurzelverzweigung, Wurzellänge und Biomasse (Kaldorf et al., 2005; Shahollari, 2005; Varma et al., 1999; Waller et al., 2005; Kumar et al., 2009) verkürzte den Blühbeginn, erhöhte die Blütenanzahl und die Samenzahlen (Rai et al., 2001; Barazani et al., 2005; Shahollari et al., 2007). Sirrenberg et al. (2007) berichten bei *Arabidopsis*

durch die Auxinproduktion von *P. indica* über eine Stimulation des Wurzelwachstums und der Verzweigung. Eine Studie an Soja zeigt, dass durch exogenes Auxin die Phosphataufnahme induziert werden kann (Shen et al., 2006). *P. indica* hat ähnlich positive Wirkungen auf die generativen Organe von Cyclamen wie Mykorrhiza auf andere Pflanzenarten. Beide Symbiosetypen verbessern den Zugang der Pflanzen zu Nährstoffvorräten im Boden insbesondere Phosphat und fördern dadurch u. a. die Pollenbildung und die Vitalität der Pollen und Samenanlagen. Nach Bergmann (1988, pp. 380) haben Cyclamen in einem Bereich von 2,5 - 4,0 mg P/g TM eine ausreichende Phosphor-Aufnahme.

In den Prüfgliedern mit optimalem Phosphor-Angebot lag die Phosphor-Konzentration somit im oberen Optimalbereich. Zudem hatte die Piri-Besiedelung offenbar weitere positive Effekte auf die Phosphor-Verfügbarkeit im Substrat und erhöhte infolgedessen die Phosphor-Aufnahme der Cyclamen. Bei mangelndem P-Angebot wurde die untere Grenze dieses Bereiches um mehr als 100% unterschritten. Dies weist auf eine deutlich limitierte P-Aufnahme hin, die wegen des akuten P-Mangels im Substrat auch bei Piri-Inokulation nicht mehr zu verbessern war. Die höhere P-Verfügbarkeit (+P +Piri) hatte einen eindeutig positiven Effekt auf die Vitalität von Pollen und Samenanlagen. Ohne Piri-Inokulation reduzierte sich bei optimalem P-Angebot die Vitalität deutlich. Außerdem war der Anteil homogen ausgebildeter Pollenmutterzellen mit einer Piri-Besiedelung deutlich erhöht. So entwickelte sich in Knospen der Pflanzen mit optimalem Phosphorangebot und zusätzlicher Piri-Inokulation der höchste Anteil an Tetraden mit normalen Mikrosporen. Das Auftreten von Triaden und Dyaden deutet auch hier auf Störungen in der Pollenbildung hin. Umwelteinflüsse, wie z. B. P-Mangel können Störungen in der Pollenbildung hervorrufen. Das geschieht offenbar schon in den frühen Stadien der Mikrosporogenese, die besonders sensibel auf Umwelteinflüsse reagieren.

Von Interesse für den gärtnerischen Samenbau ist der weitere Einfluss des Pilzes noch über die Pollen- und Samenanlagenlebensfähigkeit hinaus, auf die Samenzahlen und die Saatgutqualität.

Kapitel 5



Knollen der Samenträger von *C. persicum* nach *P. indica* Inokulation

5 Einfluss von *Piriformospora indica* und Phosphor-Angebot auf Befruchtung und Samenbildung bei *Cyclamen*

5.1 Zusammenfassung

Am Beispiel von *Cyclamen persicum* cv. 'Melody' wurde der Einfluss einer Wurzelbesiedelung mit dem Pilz *Piriformospora indica* (Piri) in Kombination mit optimalem und mangelndem Phosphorangebot auf vegetative und generative Merkmale wie (i) Pflanzendurchmesser, (ii) Blühzeitpunkt, (iii) Befruchtungsvorgang (Pollenschlauch-wachstum, Anteil Fruchtknoten mit Pollenschläuchen und Penetration der Pollenschläuche in die Micropyle), (iv) Aborte, (v) Samenbildung (anhand der Gewebedifferenzierung mittels Flow-Cytometrie) und (vi) Samenanzahl in vier Varianten untersucht: A. (P-optimal + Piri) x (P-optimal + Piri), B. (P-optimal - Piri) x (P-optimal - Piri), C. (P-Mangel + Piri) x (P-Mangel + Piri), D. (P-Mangel - Piri) x (P-Mangel - Piri). Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl Phosphor als auch Piri diese Merkmale deutlich beeinflussten. Dabei erwies sich das Phosphor-Angebot als dominierender Faktor. Pflanzendurchmesser, die Zahl der Pollenschläuche (PS) im Griffel, die PS-Penetration in die Mikropyle der Samenanlagen, die Geschwindigkeit der Gewebedifferenzierung in der Samenanlage sowie die Samenanzahl waren mit optimaler Phosphor-Düngung der Pflanzen deutlich besser als bei P-Mangel. Optimale Phosphor-Düngung und eine zeitgleiche Inokulation mit dem Pilz förderte die geprüften Merkmale allerdings am stärksten. Dagegen wurden für die Kombination (P-Mangel - Piri) x (P-Mangel - Piri) die niedrigsten Werte ermittelt. Eine Piri-Inokulation erhöhte den Pflanzendurchmesser, verbesserte das Pollenschlauchwachstum, beschleunigte die Samenbildung und erhöhte die Samenanzahl mit beiden P-Angeboten signifikant, jedoch insbesondere in Kombination mit optimalem Phosphatangebot. Zudem erhöhte eine Piri-Inokulation die Phosphataufnahme der Samenträger, wodurch die P-Konzentration im Blatt- und Knollengewebe zunahm.

5.2 Einleitung

Eine Vielzahl von Umweltfaktoren, insbesondere die Ernährung sowie daran beteiligte Mikroorganismen entscheiden neben genetischen Faktoren über das Pflanzenwachstum. Mykorrhiza-Pilze gehören zu einer Gruppe von Mikroorganismen, die für die Pflanzen vorteilhaft sind. Von derartigen symbiontischen Pilz-Besiedelungen profitiert die überwiegende Zahl der Pflanzenarten infolge verbesserter Nährstoffverfügbarkeit. Insbesondere gilt dies für den Phosphattransport an die Wurzel. Ein geeignetes Beispiel bieten arbuskuläre Mykorrhiza-Symbiosen (AMS). So verbessern diese Pilze den Zugang der Pflanzen zu den Nährstoffvorräten des Bodens, insbesondere zu Phosphat (P) und Zink (Zn) (Ortas and Akpinar, 2006; Cavagnaro et al., 2006).

Unter den Mikroorganismen wurden neben den Mykorrhiza-Pilzen auch andere endophytische Pilze identifiziert, die zur Förderung des Pflanzenwachstums beitragen können. Zu ihnen gehört der Pilz *Piriformospora indica* (Sebacinales), der erst 1997 zufällig bei einer Analyse von Bodenproben aus der Thar Wüste (Rajasthan, Indien) von einer Spore eines arbuskulären Mykorrhizapilzes (AMP) isoliert wurde (Verma et al., 1998). Die Inokulation mit dem Pilz *Piriformospora indica* (*P. indica*) bewirkte bei Mais eine Erhöhung der Frisch- und Biomasse (Varma et al., 1999) sowie der Wurzelanzahl und Wurzellänge (Kumar et al., 2009). Zudem förderte der Pilz durch eine frühere Blüte die Blüten- und die Saatgutproduktion (Rai et al., 2001; Barazani et al., 2005; Shahollari et al., 2007). Er stimulierte außerdem die Wirkstoffproduktion in Heilpflanzen (Oelmüller et al., 2009) und förderte die Bewurzelung von Pelargonien-Stecklingen (Drüge et al., 2007). Weiterhin führte eine Besiedelung mit *P. indica* (Piri) zu erhöhter Toleranz gegenüber leichtem Salzstress und stärkerer Resistenz gegenüber Wurzel- und Blattpathogenen (Waller et al., 2005; Serfling et al., 2007; Deshmukh et al., 2006; Deshmukh and Kogel, 2007; Sherameti et al., 2008; Baltruschat et al., 2008; Stein et al., 2008). Phosphor spielt eine wichtige Rolle bei der Blüten- und Samenbildung. So zeigten Lau und Stephenson (1994) bei Cucurbita-Pepo (Cucurbitaceae) den Einfluss von Phosphor auf die Produktion von Blüten und Samen sowie auf die Größe der Pollenkörner.

Zudem dokumentierten Poulton et al. (2001a, 2002) bei Tomaten die Auswirkungen des Phosphor-Angebotes auf die Fruchtmasse, die Samenanzahl, die Pollenanzahl pro Blüte und die Pollenqualität. Bisher liegen nur wenige Ergebnisse vor, die die positiven Wirkungen des Piri-Pilzes auf blühende Zierpflanzen zeigen (Drüge et al., 2007). Zu

diesen gehört *C. persicum*, das eine kommerziell kultivierte Zierpflanzenart ist und große Bedeutung in der europäischen Topfpflanzenproduktion hat. Bei den in Kapitel 4 dargestellten Ergebnissen führte die Inokulation mit dem Pilz bei *C. persicum* 'Melody' in Verbindung mit einer optimalen P-Ernährung zu höherer Pollen- und Samenanlagenqualität. Es ist deshalb zu vermuten, dass eine Besiedelung der Wurzeln mit dem Endophyten *P. indica* neben vegetativen auch generative Merkmale wie Befruchtung und Samenbildung, die Samenanzahl und damit die Saatgutproduktion positiv beeinflussen kann.

5.3 Material und Methoden

5.3.1 Pflanzenmaterial und Düngung

Jungpflanzen von *C. persicum* 'Melody' white (Fa. VARINOVA, NL) wurden in Kalenderwoche 28 im 5-Blattstadium in 12er Töpfe mit je 700 ml Substrat getopft (1 Pflanze je Topf). Als Substrat wurde Weißtorf (Letta Flor, S.I.A. Nordtorf) verwendet. Im Ergebnis von Vorversuchen (Kalkungsreihe) wurde der Kalkbedarf ermittelt und ein pH-Wert von 6,3 durch Beimischung von 6,15 g CaCO_3 pro Liter Torf-Substrat eingestellt (Röber und Schaller 1985). Außerdem wurden dem Torf zu Versuchsbeginn 30% des Angebots der übrigen Nährstoffe (N, P, K, Mg und Mikronährstoffe) in gelöster Form als Grunddüngung zugemischt. Die verbleibenden 70% dienten der flüssigen Nachdüngung an 12 Terminen (Fischer und Anneser 2003).

Die Phosphorversorgung war ein Prüffaktor und wurde in den Abstufungen Phosphor-Optimal und Phosphor-Mangel als $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ gedüngt (Gesamtangebot siehe Prüfvarianten A, B, C, D - davon 30% Grunddüngung als $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$: Phosphor-Optimal 129 mg/Topf, Phosphor-Mangel 16 mg/Topf).

Die flüssige Nachdüngung begann drei Wochen nach dem Topfen. In 100 ml Nährlösung wurden je Pflanze und Woche bei optimaler Phosphor-Düngung 25 mg $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ und bei Phosphor-Mangel 3 mg $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ dosiert. Im übrigen erhielten alle Pflanzen in der gleichen Nährlösung ein optimales Nährstoffangebot aus dem phosphatfreien

Mehrnährstoffdünger Flory8 (20%N, 0%P₂O₅, 16%K₂O, 1,5%MgO, 0,02%B, 0,03%Cu, 0,075%Fe, 0,050Mn, 0,001%Mo, 0,01%Zn; EUFLOR GmbH, München).

Die applizierte Düngermenge des Flory 8 ergab sich aus der optimalen Stickstoffdosis (390 mg N/Pfl; davon 30% zur Grunddüngung = 130 mg N/Topf = 585 mg Flory 8/Topf). Zur optimalen Kaliumversorgung waren insgesamt 610 mg K₂O/Pfl vorgesehen. Jedoch war die Kaliummenge des Flory8 mit 312 mg K₂O/Pfl unzureichend und wurde daher um 298 mg K₂O/Topf als K₂SO₄ ergänzt. Von den benötigten 610 mg K₂O/Pfl wurden 30% als Grunddüngung = 203 mg K₂O/Topf verabreicht. Entsprechend der flüssigen Nachdüngung wurden je Pflanze und Woche 114 mg Flory8 sowie 32 mg K₂SO₄ appliziert. In diesen Nährlösungen summierten sich die Düngermengen aus Ca(H₂PO₄)₂; Flory8 und K₂SO₄ bei Phosphor-Optimal auf 1,71 g/l und bei P-Mangel auf 1,49 g/l. Zur genauen Terminierung der flüssigen Nachdüngung wurde der aktuelle Nährstoffstatus im Substrat nach Zerche et al. (2008) 14- tägig gemessen (Substratgehalte in mg / l Torf-Substrat: Phosphor-Optimal 223 NO₃-N, 337 K; P-Mangel: 298 NO₃-N, 431 K; Messtermine N=11 bei 302 Kulturtagen). In den Prüfvarianten mit P-Mangel wurde nach Zufuhr der gesamten Phosphor-Menge (32 mg P₂O₅/Pflanze) die flüssige Nachdüngung von N und K im Vergleich zu den optimalen P-Varianten zeitweise reduziert oder eingestellt, da die P-Limitierung neben dem Wachstum auch die N- und K-Aufnahme reduzierte und so die N- und K-Vorräte im Substrat etwas anstiegen. In Variante Phosphor-Optimal erfolgte wegen der hohen N-Aufnahme während der Entwicklung der Samenkapseln eine zusätzliche N-Düngung von 101 mg Ca(NO₃)₂+4H₂O je Topf mit 100 ml Nährlösung. Das Ceteris paribus Prinzip (Gleichbehandlung aller Varianten) wurde gewahrt, indem die Varianten mit Phosphor-Mangel gleichzeitig 100 ml Wasser je Topf bekamen. Um Nährstoffverluste mit dem Drain zu verhindern, hatte jeder Topf einen eigenen Untersetzer. Die Pflanzen wurden bei 18 – 25 °C im Gewächshaus kultiviert und nach Bedarf zusätzlich mit Wasser gegossen. Blühbeginn war in der 35. Kalenderwoche.

5.3.1.1 Prüfvarianten

A. Pflanzen optimal mit Phosphor ernährt mit Piri-Inokulation (P+Piri+), 260 mg P₂O₅/Pflanze für ein nicht limitiertes Wachstum.

B. Pflanzen optimal mit Phosphor ernährt ohne Piri-Inokulation (P+Piri-), 260 mg P₂O₅/Pflanze

C. Pflanzen mit Phosphormangel mit Piri-Inokulation (P-Piri+), 32 mg P₂O₅/ Pflanze

D. Pflanzen mit Phosphormangel ohne Piri-Inokulation (P-Piri-), 32 mg P₂O₅/ Pflanze

Untersucht wurden 84 Pflanzen (7 Pflanzen/3 Wiederholungen/4 Varianten, gesamt = 84 Pflanzen).

5.3.2 Methoden

5.3.2.1 Vegetative Entwicklungen

5.3.2.1.1 Blühzeitpunkt/Verkaufsreife und Blütenanzahl

Es wurden sieben Proben je Wiederholung der vier Varianten (n = 7 Proben x 3 Wiederholungen x 4 Varianten = 84 Pflanzen).

Als Verkaufsreife wurde der Zeitpunkt gewählt, an dem acht Blüten und/oder Knospen über dem Laub standen.

Die Blütenanzahl wurde bis 29 Wochen nach dem Pikieren berechnet

5.3.2.1.2 Pflanzendurchmesser

Es wurden sieben Proben je Wiederholung der vier Varianten (n = 7 Proben x 3 Wiederholung en x 4 Varianten = 84 Pflanzen). Als Pflanzendurchmesser (Länge + Breite)/2) wurde der Zeitpunkt fünf Wochen nach der Piri-Inokulation gewählt.

5.3.2.2 Inokulation mit dem Piri-Pilz (*Piriformospora indica*) und Nachweis der Wurzelbesiedelung

Piriformospora indica wurde in dankenswerter Weise durch Herrn Dr. Baltruschat (Universität Gießen, Germany) zur Verfügung gestellt. Die Kultur des Pilzes erfolgte in PDB-Medium in 250 ml Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler (100 U/Minute) bei 23 °C. Nach 14 Tagen wurde abfiltriert und das Mycel durch Abtupfen von überschüssigem Nährmedium befreit. Die Inokulation erfolgte mit 10 ml/Pflanze einer 0,1%igen Piri-Suspension (1 g Frischmycel pro Liter Wasser) im 12-14 Blattstadium vier Wochen nach dem Pikieren (eigene Methodenentwicklung, unveröffentlicht).

7 Pflanzen/3 Wiederholungen/4 Varianten, gesamt = 84 Pflanzen. Der Nachweis des Pilzes erfolgte vier Wochen später mit Trypanblau 1% nach Phillips und Hayman (1970). Dafür wurden von den jungen weißen Wurzeln der Pflanzen je Probe zufällig 15 Stücke ausgewählt und gesammelt. Dazu wurden die Wurzeln einer Probe in ein Probengläschen überführt und mit 10% KOH 18 Minuten im Wasserbad bei +90°C erhitzt. Anschließend wurden die Probengläschen aus dem Wasserbad entnommen und die KOH-Lösung gegen 5%ige HCl-Lösung (154ml 32 %ige HCl/1000 ml A. dest.) ausgetauscht. Die Wurzeln blieben für etwa 3 min in der Lösung und waren dabei nicht im Wasserbad. Anschließend wurde die HCl-Lösung entfernt, Färbelösung (1% Trypanblau) zu den Wurzelproben gegeben und nochmals 7 min im Wasserbad bei 95 °C erhitzt. Nun wurde die Färbelösung entfernt, 96%iges Ethanol auf die gefärbten Wurzeln gegeben und nochmals im Wasserbad bei 95 °C für 2 min erhitzt (Ethanol entfernt die überschüssige Farbe und entlüftet gleichzeitig das Gewebe).

Anschließend wurde das Ethanol gegen Lactolösung ausgewechselt (Lactolösung: Milchsäure, 87% Glycerin und A. dest im Verhältnis 1:2:1 mischen). Die Wurzeln von 25 Stücken wurden nun geschnitten, dann mit Milchsäure (90%) in Längsrichtung auf einen Objektträger aufgesetzt und mit Deckglas versehen. Die Untersuchung erfolgte mittels Durchlichtmikroskopie. Nach viermaligem Zählen (von oben nach unten) wurde der prozentuale Anteil der Wurzeln mit Piri-Besiedelung errechnet.

5.3.2.3 Bestäubungsgruppen

Bestäubungen erfolgten innerhalb der vier Prüfvarianten (1 = A x A, 2 = B x B, 3 = C x C, 4 = D x D) unter Verwendung eines Pollengemisches, gewonnen aus allen Pflanzen der jeweiligen Prüfvariante. Kurz vor Anthesebeginn wurden die Blüten kastriert und bestäubt. In den Bestäubungsgruppen 1 und 2 wurden 30 Blüten und in den Gruppen 3 und 4 jeweils 37 Blüten bestäubt.

5.3.2.4 Befruchtungsvorgang

Es wurden dreißig Blüten pro Bestäubungsgruppe (3 Wiederholungen à 10 Blüten je Variante) bestäubt. Nach 14 Tagen wurden Quetschpräparate hergestellt und mittels Fluoreszenzmikroskopie (Leitz DMRB, LEICA, Germany) folgende Merkmale ermittelt: Anzahl der Pollenschläuche (PS) im Griffel, Anteil Blüten mit PS im Fruchtknoten und Anteil Samenanlagen mit PS-Penetration. Zur Anfärbung wurde Anilinblau verwendet (Naether, 1971). Die Einbettung der Objekte erfolgte in Propan-1,2,3-triol.

5.3.2.5 Flowcytometrische Messungen (Samenbildung)

Die Abnahme der Samenkapseln erfolgte vier, fünf und sechs Wochen nach der Bestäubung (45 Blüten = 3 Wiederholungen x 5 Blüten je Variante x 3 Termine). Von jeder Blüte wurden 10-15 Samenanlagen analysiert. Diese wurden von der Plazenta abpräpariert und als Mischprobe in 400 µl Partec CyStain UV Precise Nuclei Extraction Lösung (Partec GmbH, Germany) überführt. Die Lösung wurde zuvor mit 1% Polyvinylpyrrolidon (Polyvidon 25, Merck) versetzt. Die Samenanlagen wurden mit einer Rasierklinge zerkleinert und die Suspension durch einen 50µm Filter gefiltert. Nach zwei Minuten erfolgte die Färbung in 1600 µl einer Partec CyStain UV Precise Staining Buffer Lösung (Partec GmbH, Germany), welche wiederum mit 1% Polyvinylpyrrolidon versetzt wurde. Nach weiteren zwei Minuten erfolgte die Bestimmung des relativen DNA-Gehaltes mit einem Flowcytometer PA (Partec, Münster). Es wurden jeweils 10000 Partikel analysiert.

Aus dem Quotienten hexaploider und triploider Samenzellen (6C/3C-Verhältnis) ergab sich der Entwicklungsindex (Mitoseindex) für die Endosperm Bildung.

5.3.2.6 Phosphorkonzentration in den Pflanzen

Die P-Konzentration in Blattproben wurde je Wiederholung der vier Prüfvarianten vier bis acht Monate nach der Inokulation an drei Terminen (Dezember, Februar, April) untersucht. Zu Versuchsende (August) wurde Phosphor auch in den Knollen bestimmt. Zur Bestimmung der Phosphorkonzentration wurde nach Trocknung (48h bei 60°C) und Pulverisierung 250 mg Pflanzenmehl zum mikrowellengestützten Säureaufschluss (2 ml 65% HNO₃, µPREP-A Mikrowellen-System, MLS GmbH, Leutkirch, Germany, Lautenschläger and Kopp, 2000) verwendet. Die Aufschlusslösung wurde auf ein Endvolumen von 50 ml aufgefüllt und darin die P-Konzentration mit der Vanadat-Molybdat-Methode bei 440 nm am Spektralphotometer (V-550; Jasco Corp., Tokyo, Japan) gemessen (Zerche et al.2008). Die Phosphorgehalte wurden in mg pro Gramm Trockenmasse ermittelt.

5.3.2.7 Statistische Verfahren

Für die statistische Analyse der Daten wurde das Software-Paket Statistika 6.1 (STATSOFT, TULSA, USA) verwendet. Die Messdaten der Prüfmerkmale (Blütenanzahl, Blühzeitpunkt/Verkaufsreife, Pflanzendurchmesser, Entwicklungsindex, Samenzahl pro Kapsel, Phosphorkonzentration der Sprossorgane) wurden mittels ANOVA/MANOVA in ein- bzw. mehrfaktoriellen Designs analysiert. Der multivariate Zusammenhang zwischen der Anzahl Pollenschläuche (PS) im Griffel und dem Anteil Samenanlagen mit PS-Penetration wurden mittels Wilks's Lambda untersucht. Die Mittelwertdifferenzen wurden mit Tukey HSD Test's bei $\alpha = 0,05$ auf Signifikanz geprüft.

5.4 Ergebnisse

5.4.1 Vegetative Entwicklungen

5.4.1.1 Blühzeitpunkt/Verkaufsreife und Blütenanzahl

Der Blühzeitpunkt (acht Blüten über dem Laub) verzögerte sich im Vergleich zu den optimal mit Phosphor ernährten Pflanzen durch Phosphor-Mangel signifikant um fünf bzw. sechs Wochen. Zwischen den Varianten A und B ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Die Höhe der Phosphor-Düngung stand nicht in Wechselwirkung mit einem möglichen Effekt der Pilzinokulation. Die Pilzinokulation führte in den entsprechenden Prüfvarianten zur Besiedelung der Pflanzenwurzeln mit *Piriformospora indica*. Im Ergebnis blühten die Pflanzen beider Phosphorvarianten durchschnittlich eine Woche früher als ohne Inokulation. Die relativ geringen Unterschiede ließen sich jedoch statistisch nicht absichern.

Die mittlere Blütenanzahl wurde erheblich von der Phosphordüngung und nur relativ wenig von der Piri-Inokulation beeinflusst. So entwickelten sich bis 29 Wochen nach dem Pikieren bei optimalem Phosphorangebot ohne Piri 47 bzw. mit Piri 51 Blüten. Dagegen reduzierte Phosphormangel die Blütenanzahl signifikant um 62 bzw. 59% auf 18 bzw. 21 Blüten. Die Höhe der Phosphor-Düngung stand nicht in Wechselwirkung mit der Inokulation. Nach Piri-Inokulation war die mittlere Blütenanzahl im Mittel nur geringfügig höher.

5.4.1.2 Pflanzendurchmesser

Fünf Wochen nach der Inokulation zeigten sich signifikante Unterschiede im Pflanzendurchmesser (Länge + Breite/2). Pflanzen der Variante A hatten mit einem mittleren Durchmesser von 18,81 cm den signifikant höchsten Zuwachs, gefolgt von Variante B mit 17,22 cm. Bei Phosphormangel betrug der Durchmesser nur 12,5 cm (Variante C) und 11,57 cm (Variante D).

5.4.2 Besiedelungsgrad mit *Piriformospora indica*

Die Besiedelung der Wurzeln mit *P. indica* wurde in allen inokulierten Pflanzen nachgewiesen. Der Besiedlungsgrad der Cyclamenwurzeln wurde von der Phosphordüngung beeinflusst. So erreichte er in der Variante mit Phosphor-Mangel 36,7% und war damit der Variante mit optimalem Phosphorangebot (22,7%) signifikant überlegen.

5.4.3 Befruchtungsvorgang

In Abbildung 1 werden Pollenschläuche (PS) im Griffel (1A) sowie die Pollenschlauch-Penetrationen in die Mikropylen von Samenanlagen (1B) 14 Tage nach der Bestäubung gezeigt.

Der Phosphorstatus und die Piri-Inokulation beeinflussten das Pollenschlauchwachstum. In den Bestäubungsgruppen mit optimaler Phosphor-Versorgung wurden signifikant mehr Pollenschläuche beobachtet als bei P-Mangel (Abb. 2). Die Inokulation mit Piri erhöhte die mittlere Anzahl PS im Griffel und den Anteil Samenanlagen mit penetrierenden PS nicht signifikant. Die mittlere Anzahl Samenanlagen je Fruchtknoten betrug ca. 180. Die Wirkung des optimalen P-Angebotes zeigen die Varianten A (P+Piri+) und B (P+Piri-). In der Bestäubungsgruppe 1 war die mittlere Anzahl PS im Griffel mit 44,9 und der prozentuale Anteil der Samenanlagen, deren Mikropylen von PS penetriert waren mit 6,1% am höchsten (Abb. 2). Auch Bestäubungsgruppe 2 erzielte relativ hohe Werte. So wurden für die Anzahl PS im Griffel 39,5 und für den Anteil der Samenanlagen mit PS-Penetration 3,7% ermittelt. Dagegen wurden bei P-Mangel (Bestäubungsgruppen 3 und 4) deutlich geringere Werte gefunden. Die Bestäubungsgruppe 4 (P-Piri-) wies die geringste Anzahl PS im Griffel (16,6) und die niedrigsten Penetrationsraten (0,2%) auf. Bei P-Mangelpflanzen unter dem Einfluß von Piri (Bestäubungsgruppe 3) war das PSW mit im Mittel 18,6 PS im Griffel und lediglich 0,5% penetrierter Samenanlagen geringfügig jedoch nicht signifikant besser, aber immer noch deutlich unter den Werten der P+ Varianten (Abb. 2).

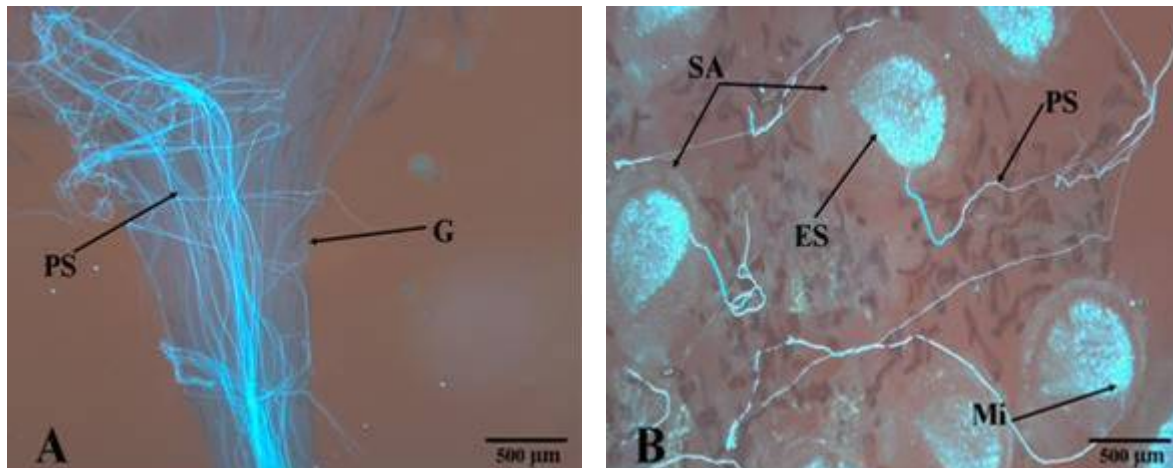


Abb. 1. Pollenschläuche im mittleren und unteren Griffelteil (A) und Pollenschlauch-Penetration in die Mikropylen der Samenanlagen 14 Tage nach der Bestäubung (B), PS = Pollenschlauch, G = Griffel, SA = Samenanlage, ES = Embryosack, Mi = Micropyle

Deutliche Unterschiede zeigten sich zwischen den Bestäubungsgruppen im Anteil der Fruchtknoten mit PS. So waren bei Kombinationen mit optimalem Phosphor-Angebot (Bestäubungsgruppen 1 und 2) in 100% der Fruchtknoten PS eingewachsen unabhängig davon, ob eine Piri-Inokulation stattfand oder nicht. Dagegen verringerte sich bei mangelndem Phosphor-Angebot (Bestäubungsgruppen 3 und 4) der Anteil auf 70% bzw. 60%.

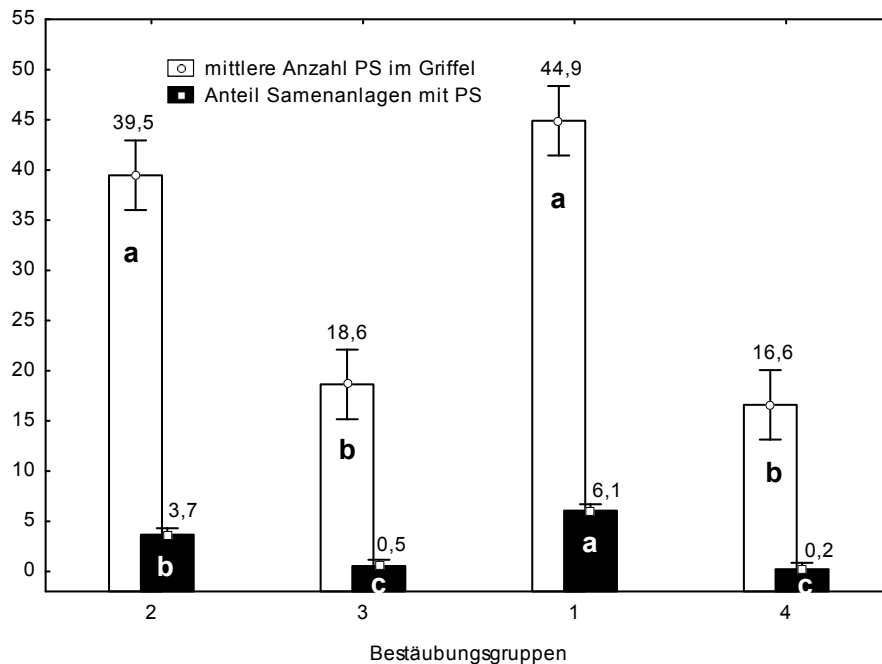


Abb. 2. Einfluss der Kreuzungskombination (Bestäubungsgruppe 1 = A x A = P+Piri+ x P+ Piri+, 2 = B x B = P+Piri- x P+Piri-, 3 = C x C = P-Piri+ x P-Piri+, 4 = D x D = P--Piri- x P-Piri-) auf die mittlere Anzahl Pollenschläuche (PS) im Griffel und auf den Anteil Samenanlagen mit PS-Penetration 14 Tage nach der Bestäubung. Für den multivariaten Zusammenhang der Prüfmerkmale ergab Wilks' Lambda = 0,28 mit $F(6,230)=34,102$, $p=0,0000$). Verschiedene Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede bei $p \leq 0,05$ % für das jeweilige Merkmal.

5.4.4 Samenbildung

In den sehr frühen Entwicklungsstadien der Samenanlagen (4 bis 6 Wochen nach Bestäubung) war es nicht möglich, die Differenzierung des Embryos anhand des relativen DNA-Gehaltes zu analysieren, da sich die 2C/4C-Peaks der sich entwickelnden Integumente und des Embryos überschneiden.

Dagegen bewirkte die Differenzierung des Endosperms typische Änderungen der 6C/3C-Peaks, die in den Varianten mit Piri-Inokulation über alle Termine eine beschleunigte Samenbildung belegen. Dieser Effekt war insbesondere bei optimalem P-Angebot ausgeprägt (Abb. 3A). Phosphormangel hingegen verlangsamte die Samenbildung (Abb. 3B).

Ein signifikant positiver Effekt der Piri-Inokulation war insbesondere in der vierten Woche nach der Bestäubung zu erkennen (Abb. 3, 4). Im Verlauf von vier bis sechs Wochen nach der Bestäubung war eine kontinuierliche Differenzierung der Endospermzellen anhand der signifikanten Abnahme des Quotienten aus der Anzahl hexaploider und triploider Zellkerne (6C/3C-Index) nachweisbar. Nach sechs Wochen war in allen Bestäubungsgruppen (1, 2, 3, 4) der niedrigste Wert erreicht, der zwischen 0,05 und 0,28 variierte. Im Unterschied dazu variierte der Quotient in der fünften Woche von 0,14 bis 0,41 und in der vierten Woche von 0,39 bis 1,04 (Abb. 4). Zu jedem der drei Termine unterschieden sich die vier Varianten dabei ebenfalls signifikant im Entwicklungsstadium ihrer Endospermzellen (6C/3C-Index). So entwickelte sich das Endosperm in Pflanzen mit optimaler Phosphor-Düngung und Piri-Inokulation A (P+Piri+) am besten und erzielte mit 0,39, 0,14 und 0,05 jeweils nach 4, 5 und 6 Wochen die kleinsten Werte. Die Variante ohne Piri-Inokulation (B) folgte mit einem relativ kleinen Unterschied aber signifikant höheren Indices von 0,5, 0,23, 0,12, die eine leicht verzögerte Endospermentwicklung anzeigen. Dagegen verlangsamte sich die Entwicklung der Samen unter Phosphormangel (Variante C und D) erheblich. Dennoch verringerte sich der 6C/3C-Index auch unter P-Mangel in Kombination mit Piri (0,81, 0,36, 0,23) schneller als ohne Piri (1,04, 0,41, 0,28), wobei die geringen Unterschiede in Woche fünf und sechs nicht mehr signifikant waren (Abb. 4). Die Höhe der Phosphordüngung hatte als Haupteffekt (Mittelwerte der zwei Piri-Varianten) einen deutlichen positiven Einfluss auf die Differenzierung der Endospermzellen (6C/3C-Index). So zeigte der Entwicklungsindex (6C/3C-Index) zu allen drei Beobachtungsterminen (4, 5 und 6 Wochen nach Bestäubung) mit 0,44, 0,19 bzw. 0,08 für die Pflanzen mit optimalem Phosphor-Angebot einen klaren Entwicklungsvorsprung, insbesondere nach Piri-Inokulation. Dagegen wurden mit Phosphormangel deutlich höhere Index-Werte von 0,93, 0,39 bzw. 0,25 ermittelt, die eine langsamere Samenbildung anzeigen.

Dabei waren die Differenzen zwischen den Indexwerten bei P-Optimal und P-Mangel besonders vier Wochen nach der Bestäubung mit 0,49 hoch signifikant und verringerten sich stetig in Woche 5 und 6 auf 0,2 und 0,17. Auch die Piri-Inokulation hatte eindeutig positive Auswirkungen (Haupteffekt: Mittelwerte der zwei Phosphor-Varianten). So erwiesen sich zu jedem Termin die relativ kleinen Unterschiede zwischen den Behandlungen mit und ohne Piri als signifikant. In den Wochen 4, 5 und 6 nach Bestäubung verringerten sich die Unterschiede kontinuierlich von 0,17 über 0,07 auf 0,06.

Sie ergeben sich als Differenzen aus den tatsächlich beobachteten Index-Werten für Varianten mit Piri-Inokulation (4, 5 und 6 Wochen nach Bestäubung 0,60, 0,25, 0,14) und solchen ohne Piri-Inokulation (0,77, 0,32, 0,20). Mit zunehmender Entwicklungsdauer nimmt der Anteil 3C-Zellen zu und somit die Zellteilungsaktivität ab. Endoreduplikation wurde nicht beobachtet.

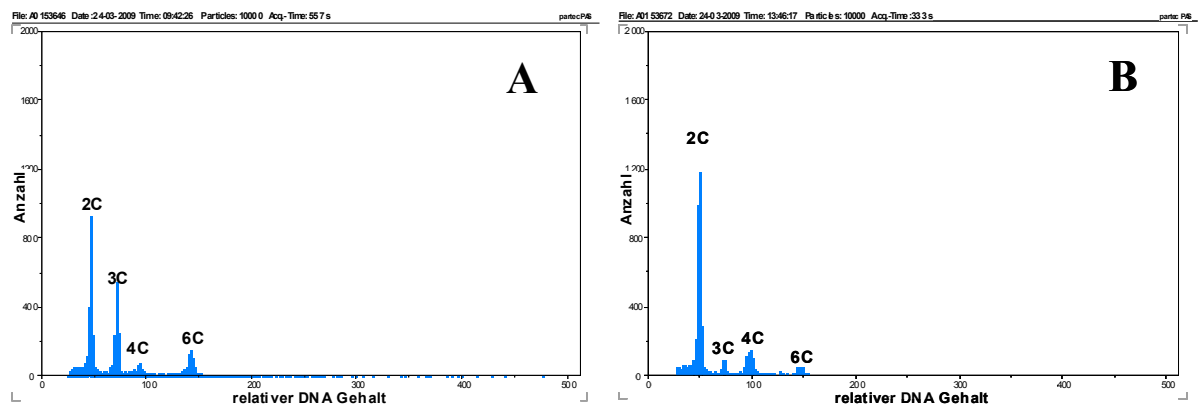


Abb. 3. DNA- Histogramme der Samenbildung vier Wochen nach der Bestäubung von *C. persicum* cv. in zwei ausgewählten Bestäubungsgruppen: A: 1 = A x A = P+Piri+ x P+Piri+, B: 4 = D x D = P-Piri- x P-Piri-, 2C+ 4C = Integumente, Embryo, 3C + 6C = Endosperm

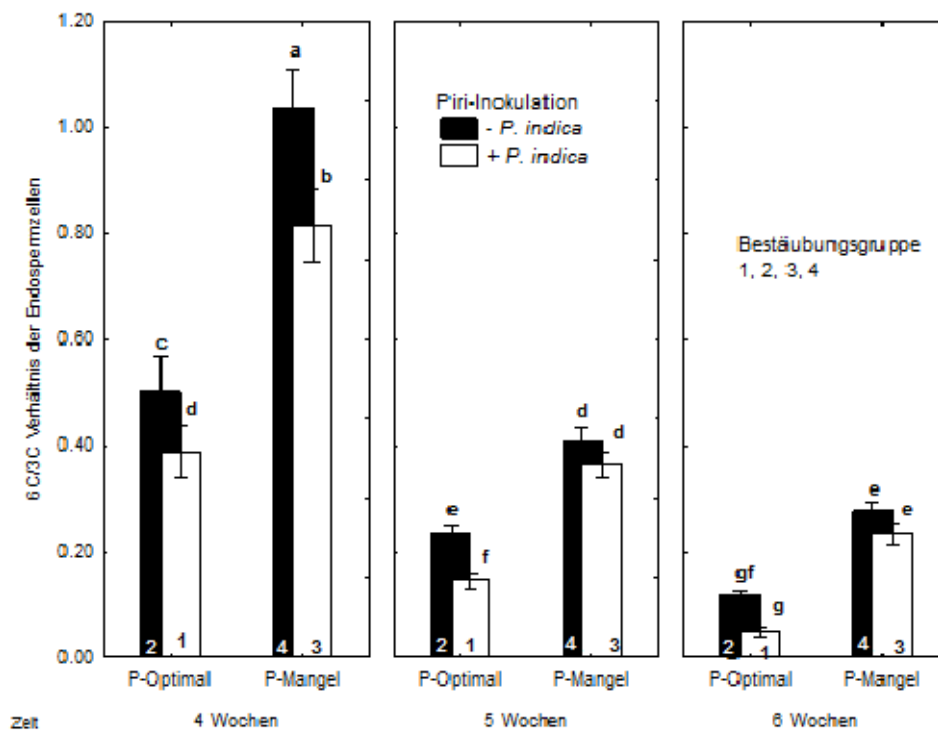


Abb. 4. Differenzierung des Endosperms vier bis sechs Wochen nach der Bestäubung bei differenziertem P-Angebot mit oder ohne Piri-Inokulation in vier Bestäubungsgruppen (1 = A x A = P+Piri+ x P+ Piri, 2 = B x B = P+Piri- x P+Piri 3 = C x C = P-Piri+ x P-Piri+, 4 = D x D = P-Piri- x P-Piri-), dreifache Wechselwirkung von Phosphorstatus x Piri-Inokulation x Zeit nach Bestäubung: Eine dreifaktorielle ANOVA zeigte signifikante Effekte: $F(2, 169) = 5,4876$, $p < 0,005$; 6C/3C-Verhältnis = Entwicklungsindex. Verschiedene Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede bei $p \leq 0,05\%$.

5.4.5 Samenanzahl

Das Phosphorangebot erwies sich erwartungsgemäß als dominierender Faktor für die mittlere Samenanzahl pro Kapsel. Aber auch *P. indica* beeinflusste die Samenanzahl pro Kapsel (Abb. 5). Die höchste mittlere Samenanzahl von 77,7 Samen pro Kapsel entwickelte sich, wenn bei optimaler P-Düngung auch eine Piri-Inokulation erfolgte (Bestäubungsgruppe 1). Ohne Piri-Inokulation (Bestäubungsgruppe 2) erreichte die Samenanzahl bei gleichem P-Angebot einen nur unwesentlich geringeren Wert von 70,7. Bei P-Mangel verringerte sich die mittlere Samenanzahl auf 36,3 mit Piri (3) und auf 28,9 ohne Piri (4). Während in den Bestäubungsgruppen 1 und 2 20,0% bzw. 23,3% der

bestäubten Blüten abortierten, war der Anteil in den Gruppen 3 und 4 (P-Mangelvarianten) mit 59,5 % und 56,8 % wesentlich höher. Die Wechselwirkung zwischen P-Düngung und Piri-Inokulation blieb jedoch ohne signifikanten Einfluss. Dagegen waren die Haupteffekte für P-Düngung und Piri-Inokulation signifikant. Bei optimaler Phosphor-Düngung wurden im Mittel der beiden Piri-Varianten 74,2 Samen und bei P-Mangel nur 32,6 Samen pro Kapsel ausgebildet. Zudem entwickelten sich mit Piri-Inokulation im Mittel der P-Düngungsvarianten 57,0 und ohne Piri nur 49,8 Samen pro Kapsel. Somit bewirkte die Piri-Inokulation eine signifikante Zunahme der Samenanzahl pro Kapsel von 12,6%.

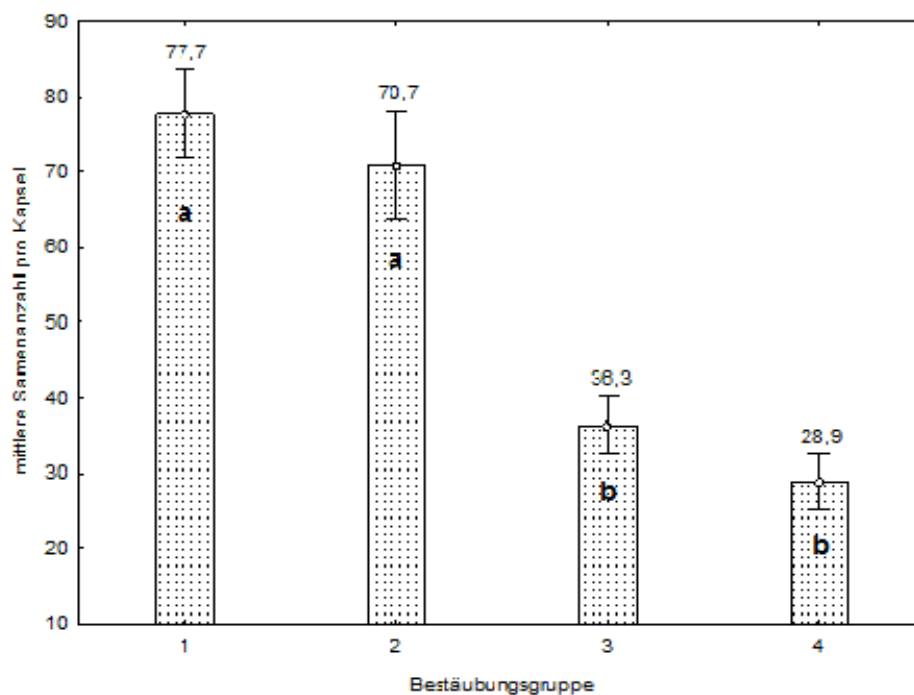


Abb. 5. Vergleich der mittleren Samenzahlen pro Kapsel in Abhängigkeit von den vier Bestäubungsgruppen (1 = A x A = P+Piri+ x P+ Piri, 2 = B x B = P+Piri- x P+Piri, 3 = C x C = P-Piri+ x P-Piri+, 4 = D x D = P-Piri- x P-Piri-); Die Varianzanalyse ergab einen signifikanten Effekt: $F(3, 56) = 95,150$, $p = 0,0000$; (Verschiedene Buchstaben a, b kennzeichnen signifikante Mittelwertdifferenzen bei $p \leq 0.05$)

5.4.6 Phosphorkonzentration der Samenträger

5.4.6.1 Einfluss von Phosphorangebot, Sprossorgan und Entwicklungsstadium

Die Phosphorkonzentration der Sprossorgane (Blätter bzw. Knollen) wurde in allen Entwicklungsstadien nachhaltig und dauerhaft vom Phosphor-Angebot bestimmt (Abb. 6A). Die erheblichen Unterschiede zwischen optimaler und limitierter Phosphor-Düngung waren in jedem Stadium signifikant. So akkumulierten die Blätter von Cyclamen mit optimalem P-Angebot zwischen 3,6 und 4,3 mg P pro g TM. Bei mangelndem P-Angebot verharrte die P-Konzentration im Spross dagegen im Mangelbereich zwischen 0,9 und 1,4 mg P pro g TM (Abb. 6A). In den einzelnen Entwicklungsstadien hatte das Phosphor-Angebot zudem spezifische Auswirkungen auf die P-Gehalte der Sprossorgane. So stieg der Phosphor-Gehalt der Blätter bei optimaler P-Düngung zunächst in der lichtarmen Jahreszeit marginal (7,5% relativer Anstieg von Dezember bis Februar) und sank mit zunehmender Wachstumsintensität im Frühjahr sogar signifikant unter das Niveau vom Dezember (16,3% relative Abnahme von Februar bis April). Mangelndes P-Angebot reduzierte die P-Konzentrationen der Sprossorgane zudem mit zunehmender Versuchsdauer signifikant von 1,4 auf 0,9 mg P pro g TM (26% relative Abnahme von Februar bis April) (Abb. 6A).

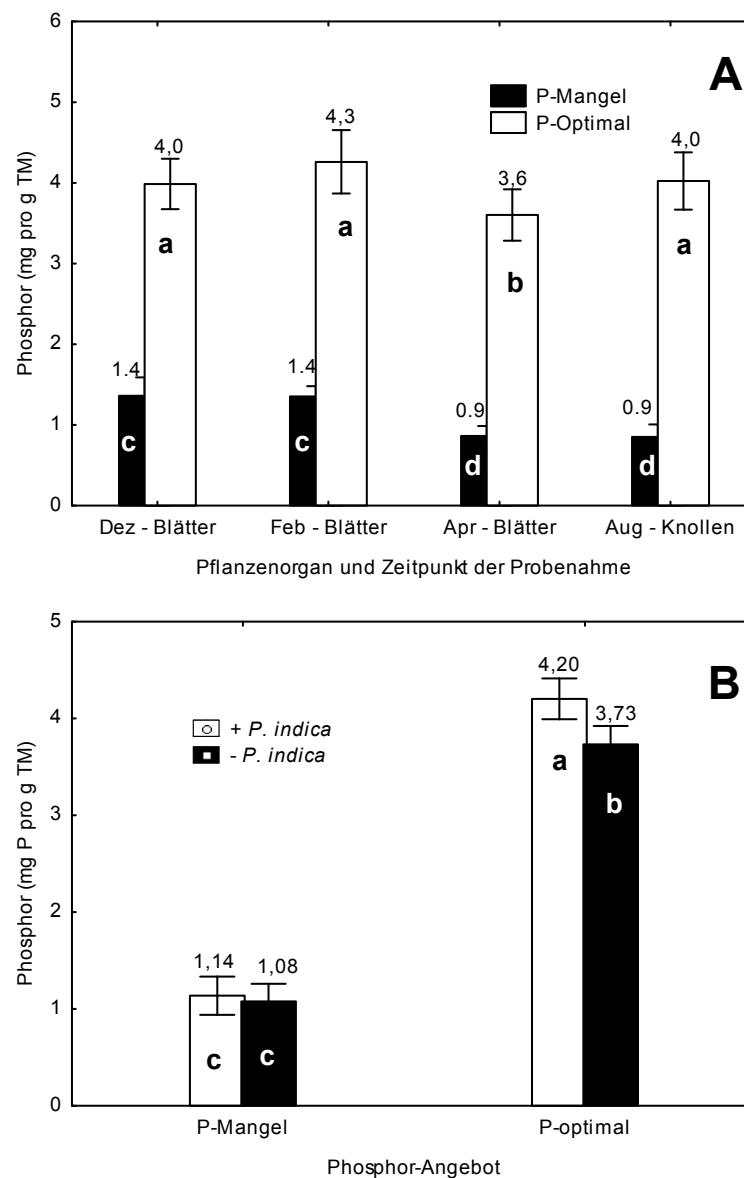


Abb. 6. (A) Einfluss von Phosphor-Angebot und Untersuchungstermin (Dezember, Februar, April, August) auf die P-Konzentration vegetativer Sprossorgane der Cyclamen-Samenträger (im Mittel der Piri-Applikationen: mit und ohne Piri) Signifikanter Effekt: $F(3, 32) = 4,329$, $p = 0,011$. (B) Einfluss von Phosphorangebot und Piri-Inokulation auf die P-Konzentration der Trockenmasse (im Mittel der Sprossorgane und Untersuchungstermine: Blätter und Knollen, Dez, Feb, Apr, Aug); Signifikanter Effekt: $F(1, 32) = 12,843$, $p = 0,001$. (Verschiedene Buchstaben a, b, c, d kennzeichnen signifikante Mittelwertdifferenzen bei $p \leq 0,05$).

5.4.6.2 Einfluss von Phosphorangebot und Piri-Inokulation

Die P-Konzentration der Pflanzen wurde von einem signifikanten, aber relativ schwach ausgeprägten Wechselwirkungseffekt zwischen Phosphorangebot und Piri-Inokulation beeinflusst (Abb. 6B). Dieser basierte auf unterschiedlich stark ausgeprägten Effekten beider Hauptwirkungen. Dabei erwies sich das Phosphorangebot zunächst als dominierender Faktor. Die Piri-Inokulation erhöhte die Phosphor-Konzentration der Pflanzen im Mittel der beiden P-Angebote zwar nur geringfügig aber statistisch signifikant um 0,3 mg P von 2,4 auf 2,7 mg P pro g TM. Die höchste Phosphor-Konzentration von 4,2 mg P pro g TM wurde gemessen, wenn optimale Phosphor-Düngung mit einer Piri-Inokulation kombiniert wurde (Abb. 6B). Ohne Piri-Inokulation reduzierte sich die Phosphor-Konzentration bei gleichem Phosphor-Angebot signifikant (um 0,5 mg auf 3,7 mg P). Dagegen stiegen die Phosphor-Gehalte bei limitierter Phosphor-Düngung durch Piri-Inokulation nur gering an (1,14 mg P mit Piri und 1,08 mg P ohne Piri) und Piri blieb ohne gesicherten Einfluss.

5.5 Diskussion

Störungen in der Befruchtung und Samenbildung können sowohl genetisch bedingt sein, als auch von der Umwelt beeinflusst werden. Von den Umwelteinflüssen spielt neben der Temperatur und der Luftfeuchte insbesondere die Nährstoffversorgung eine große Rolle für die komplexen Entwicklungsprozesse während der Befruchtung und Samenbildung.

Reife Pollen enthalten verschiedene Nährstoffe, die eine Voraussetzung für eine gute Pollenkeimung und das Pollenschlauchwachstum sind (Baker and Baker, 1979; Mascarenhas, 1989). Phosphor (P) ist ein wesentlicher Makronährstoff, der an vielen physiologischen und biochemischen Prozessen beteiligt ist. Dazu gehören z.B. die Photosynthese sowie die Synthese von Proteinen und Vitaminen. Zusätzlich ist Phosphor ein wesentlicher Bestandteil im Energie-Transport-System aller Zellen (Johnston und Steen, 2000).

Zudem ist er ein wichtiger Bestandteil der Phospholipide in Zellmembranen und Zellwänden, die beim Pollenschlauchwachstum rapide synthetisiert werden müssen (Steer und Steer, 1989).

Phosphor fördert aber auch die Blütenentwicklung und korreliert positiv mit dem Niveau der an der Blütenbildung beteiligten Phytohormone z.B. den Cytokinin (Marschner, 1995). Für Phosphor wurde ein wesentlicher Einfluss auf den Knospenansatz, die Blütenanzahl, die Größe der Pollenkörner und die Samenbildung nachgewiesen. Lau und Stephenson (1994) zeigten bei *Cucurbita-Pepo* (*Cucurbitaceae*), dass Phosphor deutliche Auswirkungen auf die Größe eines Pollens sowie die Blüten und Samenproduktion hat. Schließlich berichten Poulton et al. (2001a, b) von Tomaten, dass Phosphor die Pollenmenge sowie die Pollenqualität (d. h. Pollenkeimung in vitro und das Pollenschlauchwachstum) beeinflusst.

Für Cyclamen bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie dies erstmals. Wie erwartet, traten mit mangelndem Phosphorangebot deutliche Effekte auf vegetative und generative Merkmale, den Befruchtungsvorgang, die Samenbildung und die Samenanzahl zutage. Der Pflanzendurchmesser, die Anzahl der Pollenschläuche (PS) im Griffel, der Anteil Blüten mit PS im Fruchtknoten und der Anteil Samenanlagen mit PS-Penetration sowie die Samenbildung (Differenzierung der Endospermzellen) war bei optimaler P-Düngung der Pflanzen wesentlich besser als bei P-Mangel. Auch die Samenanzahl je Kapsel war positiv mit dem Phosphorangebot korreliert.

Zu den Umweltfaktoren im weiteren Sinn gehört auch das mikrobielle Umfeld. So sind durch Mykorrhiza weitere positive Beiträge zur Befruchtung und Samenbildung möglich. So verbesserte Mykorrhiza die Nährstoffaufnahme aus dem Boden, insbesondere die Aufnahme von Phosphor und Zink (Neumann und George, 2004; Cavagnaro et al., 2006; Ortas und Akpinar, 2006). Zudem zeigten Mykorrhiza-besiedelte Pflanzen zusätzliche positive Effekte bei der Pollenproduktion und der Samenbildung (Lau et al., 1995; Poulton et al., 2002).

Piriformospora indica (Sebacinales), ein Pilz der phylogenetisch in der Nähe von Mykorrhiza-Endosymbionten von Orchideen und ericoiden Wurzeln einzuordnen ist, fördert ebenfalls das Wachstum und den Ertrag verschiedener Pflanzenarten (Varma et al., 1999; Rai et al., 2001; Weiß et al., 2004). So hat auch *Piriformospora indica* (*P. indica*) positive Wirkungen auf Pflanzen, die nicht allein auf der Nährstoffverfügbarkeit beruht und an der kürzeren Entwicklungsdauer bis zum Blühbeginn sowie erhöhten Blüten- und Samenzahlen ersichtlich wird (Rai et al., 2001; Barazani et al., 2005; Shahollari et al., 2007).

Als Ursachen für derartige Wachstumseffekte werden (i) eine Verbesserung des Wurzelwachstums der Wirtspflanzen (Varma et al., 1999; Rai et al., 2001; Rai und Varma, 2005), (ii) eine stärkere Verzweigung der Seitenwurzeln und die Entwicklung längerer Wurzelhaare (Peskan-Berghöfer et al., 2004) sowie (iii) eine Verbesserung der Phosphoraufnahme diskutiert. So erörtern Pham et al. (2004), Shahollari et al. (2005) und Oelmüller et al. (2009) neben positiven Effekten von *P. indica* auf die Phosphatzufuhr auch (i) den Einfluss von *P. indica* auf die Bildung von Phytohormonen wie Ethylen, Auxinen und Cytokinen (Sirrenberg et al., 2007; Vadassery et al., 2008). Exogene Auxinzugabe induzierte diesbezüglich eine verbesserte Phosphataufnahme (Shen et al., 2006). Auxine wirken hemmend auf den Austrieb von Seitenknospen und die Ausbildung von Trenngewebe beim Blatt-, Blüten- und Fruchtfall. Darüber hinaus fördern Auxine die Seiten- und Adventivwurzelbildung. Die Entwicklung von Samen und Früchten wird ebenfalls begünstigt. Cytokine können Alterungsprozesse, besonders Blattseneszenzen verzögern und spielen eine wichtige Rolle bei der Nährstoffverteilung innerhalb der Pflanze. Aktuelle Studien zeigen, dass *P. indica* Bakterien im Zytoplasma enthält, die ähnliche Wirkungen auf das Pflanzenwachstum und die Abwehrreaktionen zeigen wie der Pilz (Sharma et al., 2008).

Auch für Cyclamen konnte nachgewiesen werden, dass *P. indica* positive Auswirkungen auf vegetative und generative Merkmale, wie die Blütenanzahl, Blühzeitpunkt/Verkaufsreife, den Pflanzendurchmesser, das Pollenschlauchwachstum, die Samenbildung und die Samenanzahl hat. Es kann vermutet werden, dass zwischen schnellerer Endosperm differenzierung und höherer Samenzahl ein Zusammenhang besteht. Ob auch eine bessere vegetative Entwicklung diese Merkmale beeinflusst, ist nicht bekannt. *P. indica* erhöhte die Phosphoraufnahme, die anhand einer höheren Phosphorkonzentration (mg P pro g TM) der Blatt- und Knollengewebe nachgewiesen wurde. Die erhöhte Phosphor-Konzentration ermöglicht eine Erklärung der beobachteten Wirkungen von *P. indica* auf die generativen Merkmale der Cyclamen.

Diese neuen Erkenntnisse zum positiven Einfluss des Pilzes auf das Pollenschlauchwachstum, die Samenbildung und die Samenanzahl bilden wichtige Grundlagen für den gärtnerischen Samenbau. Jedoch ist ein möglicher Einfluss auf die Saatgutqualität noch aufzuklären, ebenso wie die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auf andere Genotypen.

6 Allgemeine Diskussion

Die vorangegangenen Kapitel dieser Arbeit beschreiben Ergebnisse aus mehreren separat durchgeführten Experimenten. In den Kapiteln zwei und drei liegt der Schwerpunkt auf dem Einfluss des Genotyps auf die generativen Merkmale, und in den weiteren Kapiteln wird der Einfluss von Umweltfaktoren am Beispiel der Phosphor-Düngung und der Inokulation mit Mikroorganismen auf generative und vegetative Merkmale analysiert. Genotyp und Umwelt sind hierbei immer in Wechselwirkung zu sehen.

In diesem letzten Kapitel werden die wichtigsten Ergebnisse dieser Experimente diskutiert. Schließlich werden die Perspektiven für die weitere Forschung und die mögliche praktische Nutzung der Ergebnisse vorgestellt.

6.1 Einfluss des Genotyps auf generative Merkmale

Die Analyse vegetativer und generativer Merkmale bildet die Grundlage für die Auswahl interessanter Genotypen für die Züchtung und den kommerziellen Anbau. Damit wird eine stetige Verbesserung von Werteigenschaften wie z. B. bessere Wüchsigkeit, höherer und stabiler Samenertrag und -qualität oder Krankheitsresistenz angestrebt.

Das unterschiedliche Verhalten der Genotypen ist vom unterschiedlichen genetischen Ursprung der Genotypen abhängig. Neue interspezifische Hybriden sind in der Pflanzenzüchtung eine wichtige Quelle zur Erweiterung der genetischen Basis. Kenntnisse ihrer generativen Eigenschaften sind notwendig, um interspezifische Hybriden für Züchtungsprogramme zu nutzen und in der Praxis zu etablieren.

Die Pollenvitalität wird sowohl genetisch als auch von Umweltfaktoren bestimmt. Es ist bekannt, dass sie bei interspezifischen Hybriden reduziert sein kann (Chen et al., 2003; Nimura et al., 2003; Zhao et al., 2007; Bolaños-Villegas et al., 2008). Für interspezifische Cyclamen-Hybriden bestätigen dies die Untersuchungen von Ishizaka und Uematsu, 1992; Kobayashi und Ogawa, 1994; Ishizaka, 1996; Ewald et al., 2000 und Ishizaka, 2003. Die Ursachen für die reduzierte Pollenvitalität waren genetisch bedingt. Zu dem gleichen Ergebnis führten die eigenen Untersuchungen.

Zudem ist die Geschwindigkeit des Pollenschlauchwachstums (PSW) artspezifisch, wobei auch innerhalb einer Art Differenzen auftreten können (Odenbach, 1997). Das könnte eine Ursache für die Differenzen im PSW bei intraspezifischen *C. persicum* Kombinationen in Kapitel drei sein. Möglich wäre auch eine gewisse Inzuchtdepression, da es sich bei den *C. persicum*-Sorten um F₁-Hybriden handelt (Affre und Thompson, 1999).

Auch die Ergebnisse in den Kapiteln zwei und drei bestätigen die deutlichen Auswirkungen des Genotyps auf die generativen Pflanzeigenschaften bei den verschiedenen Hybriden zwischen *C. persicum* ($2n = 2x = 48$) x *C. purpurascens* ($2n = 2x = 34$) und *C. persicum* ($2n = 2x = 48$) x *C. hederifolium* ($2n = 2x = 34$).

Die Vitalität der Samenanlagen und Pollen (PV), die mittlere Anzahl Samenanlagen und die Quantität des Pollenschlauchwachstums waren variabel und vom Genotyp abhängig.

So hatten z. B. die interspezifischen Hybriden mit *C. hederifolium* als Kreuzungspartner eine höhere mittlere Vitalität des Pollens und der Samenanlagen als die mit *C. purpurascens*. Da aber andere mütterliche Kreuzungspartner als in den Kombinationen mit *C. purpurascens* verwendet wurden, kann keine Verallgemeinerung vorgenommen werden. Außerdem hatten die Genotypen von *C. persicum* mehr Samenanlagen als die väterlichen Partner *C. hederifolium* und *C. purpurascens*. Bei den interspezifischen Hybriden deutet sich ein Einfluss des mütterlichen *C. persicum*-Kreuzungspartners auf die Zahl der Samenanlagen an. Die Wahl des Kreuzungspartners hatte einen starken Einfluss auf das PSW (mittlere Anzahl PS im Griffel, Anteil der in die Samenanlagen eingewachsenen PS) und die Differenzierungsrate des Endosperms (Verhältnis der Endospermzellen - 6C/3C). Zum Beispiel waren die mittlere Anzahl PS im Griffel und der Anteil in die Samenanlagen eingewachsener PS bei *C. persicum* cv. x *C. hederifolium*-Hybriden höher als bei *C. persicum* cv. x *C. purpurascens*-Hybriden, während der 6C/3C-Index bei *C. persicum* cv. x *C. hederifolium*-Hybriden wesentlich niedriger als bei *C. persicum* cv. x *C. purpurascens*-Hybriden war. Das bedeutet, dass die Samenbildung bei ersteren schneller abläuft. Das belegt die wichtige Rolle des Genotyps für die generativen Merkmale.

6.2 Einfluss des Ploidiegrades auf generative Pflanzeigenschaften

Amphidiploide Hybriden haben bei verschiedenen Pflanzenarten günstigere Eigenschaften als Amphiploide, da sie im Gegensatz zu amphiploiden häufiger fertilen Pollen ausbilden und samenvermehrbar sind. So unter anderem bei Cucumis (Chen et al., 2002, 2003, 2005), Dianthus-Hybriden (Nimmura et al., 2006) und Cyclamen-Hybriden (Ishizaka und Uemastu, 1994, 1995b; Ewald et al., 2000; Ishizaka, 2008).

Zudem kommt amphidiploiden Cyclamen nach Ishizaka (2008) eine wichtige Rolle bei der Züchtung neuer Cyclamen zu, da sie eine hohe Eignung zur Kombination mit diploiden und autotetraploiden Sorten von *C. persicum* haben und zudem resistent gegenüber der Cyclamenwelke (*Fusarium axysporum* f. sp. *cyclaminis*), *Pseudomonas marginalis* und der Blattwelke (*Erwinia herbicola* pv. *cyclamenae*) sind. Amphidiploide Hybriden bildeten vitaleren Pollen als amphiploide Ishizaka und Uemastu (1994, 1995b) und Ewald et al. (2000). Weiterhin berichten Zhao et al. (2007) und Nimmura et al. (2003) bei interspezifischen und creeping bentgrass-Hybriden bzw. interspezifischen Dianthus-Hybriden von einer geringeren bzw. fehlenden Pollenvitalität. Im Kontrast dazu gelang die Wiederherstellung der Pollenvitalität bei Dianthus über eine induzierte Chromosomenzahlverdopplung (Nimmura et al., 2006). In der vorliegenden Studie wurde gezeigt (Kapitel zwei und drei), dass der Ploidiegrad der interspezifischen Hybriden einen deutlichen Einfluss auf generative Pflanzeigenschaften ausübt. So bildeten amphidiploide Hybriden im Vergleich zu amphiploiden signifikant vitalere Pollen und Samenanlagen. Zudem haben, als eine Voraussetzung für die Befruchtung und Samenbildung, nur bei Kombinationen auf amphidiploidem Niveau im Untersuchungszeitraum (14 Tage nach der Bestäubung) Pollenschläuche die Samenanlagen erreicht und es kam zur beginnenden Samenbildung (Endosperm Bildung). In Verbindung mit den Ergebnissen zum PSW und des 100%igen Aborts amphiploider Blüten nach der Bestäubung kann angenommen werden, dass es bei ihnen im Untersuchungszeitraum nicht zur Befruchtung gekommen ist.

Das bedeutet, dass die amphidiploiden Cyclamen-Hybriden bessere Voraussetzungen für die generative Vermehrbarkeit und die Einbeziehung in Züchtungsprogramme bieten als die amphiploiden.

Da amphiploide Hybriden ausschließlich in vitro vermehrbar sind, werden zukünftige Arbeiten auf die weitere Schaffung wissenschaftlicher Grundlagen für die generative

Reproduktion interspezifischer Hybriden gerichtet sein. Nur über die Samenvermehrung wird es möglich sein, diese neuen Hybriden auf Dauer als neue Cyclamen im gärtnerischen Erwerbsgartenbau zu etablieren.

6.3 Einfluss von *Piriformospora indica* auf vegetative und generative Pflanzeigenschaften sowie die Phosphoraufnahme

Seit seiner Entdeckung 1997 in Indien erhielt der Pilz viel Aufmerksamkeit. So hatte *P. indica* deutliche positive Auswirkungen auf vegetative und generative Eigenschaften verschiedener Pflanzenarten.

Der positive Effekt von *Piriformospora indica* (*P. indica*) basiert auf einer verbesserten Phosphatzufuhr.

Das deckt sich mit Ergebnisse der vorliegenden Studie. Wie vermutet, hatte die Inokulation mit *P. indica* (Kapitel vier und fünf) positive Auswirkungen auf die Phosphoraufnahme. *P. indica* erhöhte eindeutig die Phosphoraufnahme, die im Vergleich zur Kontrolle anhand einer höheren Phosphorkonzentration (mg P pro g TM) im Blatt- und Knollengewebe nachgewiesen wurde. Die Phosphattransfers von der Wurzel zum Spross deuten darauf hin, dass andere oder zusätzliche pilzliche Faktoren an der Interaktion beteiligt sind. In diesem Zusammenhang zeigte eine Studie an Soja, dass exogenes Auxin die Phosphataufnahme induzieren kann (Shen et al., 2006).

Des Weiteren hat *P. indica* auch Einfluss auf das Gleichgewicht von Phytohormonen wie Ethylen, Auxin und Cytokinin. So produziert *P. indica* das Auxin IAA (Indol-3-essigsäure, β Indolylessigsäure), das Auswirkungen auf das Wurzelwachstum von *Arabidopsis thaliana* hatte (Sirrenberg et al., 2007). *Sebacina vermifera*, ein enger Verwandter von *P. indica* (Barazani et al., 2005), erhöhte das Pflanzenwachstum bei *N. attenuata* durch Beeinträchtigung der Ethylen-Signalisierung (Barazani et al., 2007).

Darüber hinaus produziert der Pilz in relativ hohem Maße Cytokinine. Der Cytokinin-Anteil war in mit *P. indica* kolonisierten Wurzeln im Vergleich zu den unbesiedelten Kontrollen höher (Vadassery et al., 2008).

Zudem hat *P. indica* einen positiven Einfluss auf Pflanzen, wie die Verfrühung der Blüte und eine Erhöhung der Blüten- und Samenzahlen (Rai et al. 2001; Barazani et al. 2005; Shahollari et al. 2007). Das bestätigte die vorliegende Studie. *P. indica* hat ähnlich positive Wirkungen auf Cyclamen wie auf andere Pflanzenarten. So blühten die Pflanzen

durchschnittlich eine Woche früher als ohne Inokulation (Kapitel. fünf). Zudem erhöhte *P. indica* die mittlere Samenanzahl pro Kapsel (Kapitel. fünf).

Die Inokulation der Wurzeln mit dem Endophyten *Piriformospora indica* kann auch wichtige befruchtungsbiologische Parameter beeinflussen. Das wurde am Beispiel von *C. persicum* cv. in Kombination mit einem differenzierten Phosphor-Angebot deutlich. Wie vermutet, hatte die Inokulation mit *Piriformospora indica* (Kapitel vier und fünf) positive Auswirkungen auf die Vitalität der Pollen und Samenanlagen sowie die Mikrosporogenese, den Befruchtungsvorgang (Pollenschlauchwachstum, Anteil Fruchtknoten mit Pollenschläuchen und die Penetration der Pollenschläuche in die Micropyle). Auch die Samenbildung wurde signifikant positiv beeinflusst. Es wird ein Zusammenhang zwischen schnellerer Endosperm-bildung in den Samenanlagen bzw. der Samenbildung und höherem Samenertrag vermutet. Dieser Zusammenhang ist von großer Bedeutung, da hier für Cyclamen erstmals der Einfluss von Kultivierungsmaßnahmen auf die frühen Stadien der Samenbildung und die Ertragsbildung nachgewiesen wurde. Die Flowcytometrie erwies sich als eine sehr effiziente Methode für den Nachweis der Gewebedifferenzierung in den Samenanlagen. Damit wird es möglich sein, den Einfluss weiterer Faktoren auf die Samenbildung zu definieren.

6.4 Einfluss von Phosphor auf vegetative und generative Pflanzeigenschaften

Die große Bedeutung von Phosphor ist, neben Stickstoff und Kalium, bekannt. So spielt er eine wichtige Rolle in vielen physiologischen und biochemischen Prozessen wie der Photosynthese und der Synthese von Proteinen und Vitaminen.

Wie viele Studien belegen, hat Phosphor deutliche Auswirkungen auf vegetative und generative Merkmale bei verschiedenen Pflanzenarten, so ist er Bestandteil der Phospholipide in Zellmembranen und Zellwänden, die beim Pollenschlauchwachstum rapide synthetisiert werden müssen (Steer and Steer 1989).

Die Blütenentwicklung fördert Phosphor vermutlich indirekt, da ein verbessertes P-Angebot positiv mit dem Niveau der an der Blütenbildung beteiligten Phytohormone z.B. den Cytokinen korreliert (Marschner, 1995). Zudem die Pollenkorngroße sowie die Blüten und Samenproduktion bei *Cucurbita-Pepo* (*Cucurbitaceae*) (Lau und Stephenson, 1994) die Pollenmenge und die Pollenqualität (d. h. Pollenkeimung in vitro und das Pollenschlauchwachstum) bei Tomaten (Poulton et al., 2001a, b). So wird der Erfolg der

Bestäubung wesentlich von optimaler Pollenkeimung und zügigem Pollenschlauchwachstum bestimmt. Eine hohe Pollenqualität hängt wiederum von der optimalen Nährstoffaufnahme ab. Dies lässt schon die Vielzahl der Makro- und Mikronährstoffe erkennen, die im reifen Pollen nachgewiesen wurden (Baker and Baker 1979; Mascarenhas 1989). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen dies für Cyclamen. Wie erwartet, hatte mangelndes Phosphorangebot deutlich negative Effekte auf die Vitalität der Pollen und Samenanlagen, den Anteil homogen ausgebildeter Pollenmutterzellen, das Pollenschlauchwachstum [Anzahl der Pollenschläuche (PS) im Griffel, Anteil bestäubter Blüten mit PS im Fruchtknoten, Anteil Samenanlagen mit PS-Penetration], die Samenbildung [Differenzierung der Endospermzellen] und die Samenanzahl pro Kapsel sowie Pflanzendurchmesser, Blühbeginn und Blütenanzahl (Kapitel vier und fünf). Alle vegetativen und generativen Merkmale waren positiv mit dem Phosphorangebot korreliert. Die Kombination von optimaler Phosphor-Düngung und Inokulation mit dem Pilz fördert die geprüften vegetativen und generativen Merkmale am stärksten. Dagegen wurden die niedrigsten Werte beobachtet, wenn bei mangelnder Phosphor-Düngung keine *Piriformospora indica* -Inokulation stattgefunden hatte.

Für die Aufklärung des Ursache–Wirkungsmechanismus und die weitere Optimierung sind vertiefende Forschungsarbeiten notwendig. Das betrifft auch den möglichen Einfluss auf die Saatgutqualität und ebenso die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei anderen Pflanzenarten.

7 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit prüft bei der gärtnerischen Modell-Kultur *Cyclamen* den Einfluss des Genotyps (interspezifische Hybriden) auf generative Merkmale sowie bei *C. persicum* 'Melody' den Einfluss von Kultivierungsmaßnahmen wie die Besiedelung der Wurzeln durch einen symbiontischen Pilz (*Piriformospora indica*) in Kombination mit einem differenzierten Phosphor-Angebot auf vegetative und generative Merkmale: (1) Pflanzendurchmesser, (2) Blühzeitpunkt und Blütenanzahl, (3) Anzahl Samenanlagen pro Fruchtknoten, (4) Vitalität von Pollen und Samenanlagen, (5) Mikrosporogenese, (6) Befruchtungsvorgang (Pollenschlauchwachstum, Anteil Fruchtknoten mit Pollenschläuchen, Anzahl Pollenschläuche im Griffel und Penetration der Pollenschläuche in die Micropyle), (7) abortierte Blüten nach der Bestäubung (8) Samenbildung und (9) Samenanzahl.

Die Analyse generativer Merkmale interspezifischer Hybriden ist von Bedeutung für ihre Einbeziehung in Züchtungsprogramme und die weitere Reproduktion. Untersuchungen zur Vitalität von Pollen und Samenanlagen, dem Pollenschlauchwachstum (PSW) und zur Gewebedifferenzierung in den Samenanlagen von interspezifischen Hybriden zwischen *C. persicum* cv. x *C. purpurascens* und *C. persicum* cv. x *C. hederifolium* zeigten, dass amphidiploide Hybriden im Vergleich zu amphiploiden die besseren Voraussetzungen für die generative Reproduktion haben, insbesondere die zwischen *C. persicum* x *C. hederifolium*. Die Vitalität der Samenanlagen und der Pollen (PV) waren vom Genotyp und vom Ploidiegrad determiniert. Zwischen Pollenvitalität (PV) und Samenanlagenvitalität bestand eine enge positive Beziehung. Amphidiploide Pflanzen ($2n = 4x = 82$) bildeten Pollenkörner mit höherer Vitalität und mehr vitale Samenanlagen als amphiploide Pflanzen ($2n = 2x = 41$). Die PV wurde vom Verhalten der Chromosomen und der Entwicklung normaler Pollenmutterzellen während der Mikrosporogenese bestimmt. Mit steigendem Anteil bivalenter Chromosomen und homogen ausgebildeter Mikrosporen erhöhte sich die Pollenvitalität. Geringe PV war mit einer hohen Anzahl univalenter Chromosomen in den frühen Phasen der Pollenbildung und abnormer Mikrosporenentwicklung kombiniert. Die Kreuzungseltern *C. persicum*, *C. purpurascens* und *C. hederifolium* bildeten meist homogene Mikrosporen und einen höheren Anteil vitaler Pollenkörner und Samenanlagen.

Die Samenanlagenzahl in den Fruchtknoten war variabel und vom Genotyp abhängig. Sie differierte zwischen den Kreuzungseltern und auch zwischen den Hybriden. Der Befruchtungsvorgang (Pollenschlauchwachstum, Anzahl Pollenschläuche im Griffel und Penetration der Pollenschläuche in die Micropyle) und die Samenbildung waren bei den Hybriden vom Genotyp bzw. Kreuzungspartner vorgeprägt. So war die Anzahl PS im Griffel und die Penetration der Pollenschläuche in die Micropyle von Hybriden nach interspezifischer Kombination mit *C. hederifolium* als väterlicher Partner deutlich höher als bei *C. purpurascens* als väterlicher Partner. Amphiploide Hybriden zeigten im Gegensatz zu amphidiploiden nach intraspezifischer Kombination keine Pollenschlauchpenetration in die Mikropyle der Samenanlagen und keine Gewebedifferenzierung in den Samenanlagen. Kombinationen zwischen interspezifischen Hybriden amphiploid x amphidiploid und reziprok sind offenbar nicht möglich. Bei Rückkreuzungen mit den Elternformen *C. persicum* cv und *C. purpurascens* oder *C. hederifolium* war nur auf amphidiploidem Niveau eine Penetration der PS in die Mikropyle nachweisbar. Nach Kombinationen zwischen amphiploiden Partnern abortierten alle Blüten. Aborte traten dagegen bei amphidiploiden Hybriden nicht auf und in den Samenanlagen war eine deutliche Endosperm Bildung nachweisbar. Der 6C/3C Mitoseindex des Endosperms war bei amphidiploiden *C. hederifolium*-Hybriden im Gegensatz zu amphidiploiden *C. purpurascens*-Hybriden, über alle Termine signifikant niedriger, d. h. die Samenbildung verlief zügiger. Als eine Ursache für die fehlende Samenbildung bzw. die Aborte nach der Bestäubung wird bei amphiploiden Hybriden das Ausbleiben der Befruchtung in Kombination mit geringer Pollenvitalität vermutet.

Das Phosphorangebot erwies sich in der vorliegenden Arbeit bei *C. persicum* cv. als dominierender Faktor bei der Ausprägung vegetativer und generativer Pflanzeigenschaften. So entwickelten sich bei optimaler Phosphor-Düngung der Pflanzen im Mittel mehr homogene Mikrosporen sowie mehr vitale Pollen und Samenanlagen als bei P-Mangel. Weiterhin war die Zahl der Pollenschläuche (PS) im Griffel, die PS-Penetration in die Mikropyle der Samenanlagen, die Samenbildung sowie die Samenanzahl mit normaler P-Düngung der Pflanzen deutlich besser als bei P-Mangel ebenso wie Pflanzendurchmesser, Blühzeitpunkt, Blütenanzahl und Samenanzahl.

Der positive Einfluss von *Piriformospora indica* (Piri) auf vegetative und generative Merkmale wurde insbesondere in Kombination mit einem optimalem Phosphatangebot

sichtbar. Zudem erhöhte eine Piri-Inokulation die Phosphataufnahme der Samenträger, wodurch die P-Konzentration im Blatt- und Knollengewebe zunahm. Ohne Piri-Inokulation reduzierten sich die Werte bei gleichem P-Angebot. Die höchsten Werte wurden beobachtet, wenn bei normaler P-Düngung gleichzeitig eine Piri-Inokulation erfolgte.

Die Ergebnisse sind von großer praktischer Bedeutung für den Erwerbsgartenbau und sind ein wichtiger Beitrag zu den Forschungsarbeiten am IGZ.

Schlagwörter

Interspezifische Cyclamen-Hybriden, *Cyclamen persicum*, *Piriformospora indica*, Phosphor-Düngung, Vitalität, Samenanlagen, Pollen, Mikrosporogenese, Pollenschlauchwachstum, Pflanzenentwicklung, Flowcytometrie, Samenbildung, Samenertrag

8 SUMMARY

The present paper investigates *Cyclamen* as an horticultural model-culture. A main Focus is on the characteristics of the *Cyclamen* genotype, notably with interspecific hybrids. Further, *Cyclamen persicum* cv. served as a model to analyse effects on parameters of pollination, seed development and number of ovules per ovary, which are caused by a root colonization of the seed bearer with the symbiotic fungus *Piriformospora indica* (Piri) in combination with a differentiated phosphorus supply. In this regard, plant diameter, flowering time and flower number, the viability of pollen and ovules, the microsporogenesis, the growth of pollen tubes, the seed formation and the seed count were considered among important parameters of pollination and seed development.

The analysis of generative characteristics of interspecific hybrids is important for inclusion in breeding programs and for the subsequent generative reproduction of valuable genotypes. Studies on the vitality of pollen and ovules, the growth of the pollen tubes (PTG) and the tissue differentiation in ovules of interspecific hybrids between *C. persicum* cv. ($2n=2x=48$) x *C. purpurascens* ($2n=2x=34$) und *C. persicum* cv. ($2n=2x=48$) x *C. hederifolium* ($2n=2x=34$) showed, that the amphidiploide hybrids have better conditions for generative reproduction as the amphiploide hybrids, especially between *C. persicum* x *C. hederifolium*. It was found that the levels of ovule viability and pollen viability (PV) are subject to genotype and ploidy. There was a strong positive interdependence between the levels of PV and ovule viability.

Thus, amphidiploid plants ($2n=4x=82$) develop pollen grains with higher levels of viability and larger numbers of high-viability ovules than amphiploid plants ($2n=2x=41$). PV was determined by the behaviour of the chromosomes and the development of normal pollen parent cells during the process of microsporogenesis. Pollen viability increased when both the number of bivalent chromosomes as well as the homogeneously developed microspores grew. Low levels of PV coincided with large numbers of univalent chromosomes in the early stages of pollen formation and with an abnormal microspore development. The hybridization parents *C. persicum*, *C. purpurascens* and *C. hederifolium* tended to beget homogeneous microspores and a larger proportion of viable pollen grains or ovules.

The number of ovules in the ovary was variable and dependent on the genotype. In the ovary of *C. persicum* cv. more ovules were formed than in his paternal partner's *C. purpurascens* and *C. hederifolium*., and *C. purpurascens* developed fewer ovules than *C. hederifolium*. In addition, the number of ovules differed also between *C. persicum*- species and the *C. hybrids*. Certain features of the fertilization process (the growth of pollen tubes, numbers of pollen tubes (PT) in the pistils and the penetration of the pollen tube into the micropyle of an ovule) and seed formation in hybrids were determined by genotype and breeding partners. Thereby, clearly higher numbers of pollen tubes (PT) in pistils and penetrations of pollen tubes into the micropyles developed in result of intraspecific pollinations with *C. hederifolium* as compared with *C. purpurascens*.

In this regard, amphidiploid plants were outnumbered by intraspecific combinations in PTG in pistils, pollen tube penetration into the micropyle of the ovules and the tissue differentiation, while the amphiploids completely lacked in penetration. And, the intraspecific combinations among amphidiploids x amphidiploids developed clearly more PT in pistils than related combination with amphiploids.

Combinations of interspecific hybrids with amphiploid x amphiploid, amphiploid x amphidiploid and their reciprocals remained impossible. In backcrosses with the parental forms *C. persicum* and *C. purpurascens* cv. or *C. hederifolium*, any penetrations of the PT in micropyles were detectable only at amphidiploid levels. After all the combinations between amphiploid partners resulted in pervasiv development disorders with aborted flowers. In contrast, no abortions occurred with amphidiploid hybrids which enabled an adequate endosperm development in their ovules. Throughout all development stages, the 6C/3C mitotic index of endosperm cells was significantly lower with amphidiploid *C. hederifolium* hybrids as compared to amphidiploid *C. purpurascens* hybrids, while a lower index represents a quicker seed formation. With amphiploid hybrids, an absence of fertilization in combination with low pollen viability is presumed to be the cause of lacking seed formation and abortions after pollination.

In the present study, phosphorus supply was the dominant environmental factor during the formation of generative plant characteristics as compared to the root colonisation by Piri. While Cyclamen plants received normal P-fertilizer supplies they developed more highly viable pollen and ovules than those plants that were supplied less adequately. Finally, the regenerative traits as numbers of pollen tubes (PT) in pistils, PT penetration in the micropyles of ovules, seed formation and seed count of plants were much higher with

normal P-fertilization as compared to plants grown at P-deficiency. Further, plant diameter, flowering time, flower number and seed number showed same responses. However, the results of this study clearly showed the positive influence of *Piriformospora indica* on generative and vegetative traits in Cyclamen, especially in combination with an optimal phosphate supply. Thereby, Piri inoculation enhanced the phosphate absorption of the seed bearers by an increase of P-concentrations in the tissues of leaves and bulbs. Without Piri-inoculation the values were reduced at the same P-supply level. All in all, highest values were observed, while standard supplies of normal P-fertilization were combined with a Piri inoculation.

These results are of great practical importance for the commercial horticulture and are an important contribution to the research on IGZ. They prove that *Piriformospora indica* can be useful in horticulture

Keywords

Interspecific Cyclamen Hybrids, *Cyclamen persicum*, *Piriformospora indica*, phosphorus fertilization, viability, ovules, pollen, microsporogenesis, pollen tube growth, plant development, flow cytometry, seed formation, seed set

9 Literaturverzeichnis

- Adamowski, E. D. V., Pagliarini, M. S., Do Valle, C. B. (2008): Meiotic behaviour in three interspecific three-way hybrids between *Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha* (Poaceae: Paniceae). *Journal of Genetics* 87: 33-38.
- Aderkas, P von, Leary, C. (1998): Micropylar exudates in Douglas fir-timing and volume of production. *Sex Plant Reproduction* 11: 354-356.
- Affre, L., Thompson, J. D. (1999): Variation in self-fertility, inbreeding depression and levels of inbreeding in four *Cyclamen species*. *Journal of Evolutionary Biology* 12:113-122.
- Araujo, A. C. G., Falcao, R., Carneiro, V. T. D. (2007): Seed abortion in the sexual counterpart of *Brachiaria brizantha* apomicts (Poaceae). *Sexual Plant Reproduction* 20: 109-121.
- Asimi, S., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. (1980): Influence of increasing soil phosphorus levels on interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizae and *Rhizobium* in soybeans. *Canadian Journal of Botany* 58: 2200-2205.
- Azcón-Aguilar, C., Barea, J. M. (1996): Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6: 457-464.
- Baker, H. G., Baker, I. (1979): Starch in angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. *Amer J Bot* 66: 591-600.
- Baltruschat, H., Fodor, J., Harrach, B.D., Niemczyk, E., Barna, B., Gullner, G., Janeczko, A., Kogel, K.H., Schäfer, P., Schwarczinger, I., Zuccaro, A., Skoczowski, A. (2008): Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytol* 180: 501-510.
- Barazani, O., Benderoth, M., Groten, K., Kuhlemeier, C., Baldwin, I. T. (2005): *Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera* increase growth performance at the expense of herbivore resistance in *Nicotiana attenuata*. *Oecologia* 146: 234–243.
- Barazani, O., Von Dahl, C. C., Baldwin, I. T. (2007): *Sebacina vermifera* promotes the growth and fitness of *Nicotiana attenuata* by inhibiting ethylene signaling. *Plant Physiology* 144: 1223-1232.

- Barea, J. M., Azcon-Aguilar, C. (1982): Production of plant growth-regulating substances by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Applied and Environmental Microbiology* 43: 810-813.
- Bergervoet, J., Verhoeven, H., Gilissen, L., Bino, R. (1996): High amounts of nuclear DNA in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pericarp. *Plant Sci* 116: 141-145.
- Bergmann, W. (1988): Ernährungsstörungen bei Kulturpflanzen. VEB Gustav Fischer Verlag Jena. pp. 762.
- Bergounioux, C., Brown, S., Petit, P. (1992): Flow cytometry and plant protoplast cell biology. *Physiologia Plantarum* 85: 374-386.
- Bolaños-Villegas, P., Chin, S. W., Chin, F. C. (2008): Meiotic Chromosome Behavior and Capsule Setting in *Doritaenopsis* Hybrids. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 133: 107-116.
- Bosco, S. F., Tusa, N., Conicella, C. (1999): Microsporogenesis in a citrus interespecific tetraploid somatic hybrid and its fusion parents. *Heredity* 83: 373-377.
- Böhme, H. Hagemann, R., Löther, R. (1976): Beiträge zur Genetik und Abstammungslehre. Volk und Wissen Volkseigener Verlag Berlin. pp. 576.
- Caetano-Pereira, C. M., Defani-Scoarize, M. A., Pagliarini, M. S., Brasil, E. M. (1998): Syncytes, abnormal cytokinesis and spindle irregularities in maize microsporogenesis. *Maydica* 43: 235-242.
- Candau, R., Avalos, J., Cerda-Olmedo E. (1991): Gibberellins and carotenoids in the wild type and mutants of *Gibberella fujikuroi*. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 3378-3382.
- Cavagnaro, T. R., Jackson, L. E., Six, J., Ferris, H., Goyal, S., Asami, D., Scow, K. M. (2006): Arbuscular mycorrhizas, microbial communities, nutrient availability, and soil aggregates in organic tomato production. *Plant and Soil* 282: 209-225.
- Cerovic R., Ruzic, D., Micic, N. (2000): Viability of plum ovules at different temperatures. *Annals of Applied Biology* 137: 53-58.
- Chelysheva, L., Gendrot, G., Vezon, D., Doutriaux, M. P., Mercier, R. (2007): Zip4/Spo22 is required for class I CO formation but not synapsis completion in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 3(5): e83, doi: 10.1371/journal.pgen.0030083.
- Chen, J. F., Staub, J., Adelberg, J., Lewis, S., Kunkle, B. (2002): Synthesis and preliminary characterization of a new species (amphidiploid) in *Cucumis*. *Euphytica* 123: 315-322.

- Chen, J., Staub, J., Qian, C., Jiang, J., Luo, X., Zhuang, F. (2003): Reproduction and cytogenetic characterization of interspecific hybrids derived from *Cucumis hystrix* Chakr x *Cucumis sativus* L. Theor Appl Genet 106: 688-695.
- Chen, J. F., Luo, X. D., Staub, J. E., Jahn, M. M., Qian, C. T., Zhuang, F.Y., Ren. G. (2003): An allotriploid derived from an amphidiploid x diploid mating in *Cucumis*-I: production, micropropagation and verification. Euphytica 131: 235-241.
- Chen, J., Qian, C., Staub, J. E., Luo, X., Zhuang, F. (2005): Cytogenetic analysis of the primary amphidiploid derived from interspecific hybridization in *Cucumis* and its selfed progenies. Agricultural Sciences in China 4: 336-342.
- Compton, J. A., Clennett, J. C. B., Culham, A. (2004): Nomenclature in the dock. Overclassification leads to instability: a case study in the horticulturally important genus *Cyclamen* (Myrsinaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 146: 339-349.
- Deshmukh, S. D., Hueckelhoven, R., Schaefer, P., Imani, J., Sharma, M., Weiss, M., Waller, F., Kogel, K. H. (2006): The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation, during mutualistic symbiosis with barley. Proc Natl Acad Sci USA 103: 18450-18457.
- Deshmukh, S. D., Kogel, K. H. (2007): *Piriformospora indica* protects barley from root rot caused by *Fusarium graminearum*. Journal of Plant Diseases and Protection 114: 263–268.
- Drüge, U., Baltruschat, H., Franken, P. (2007): *Piriformospora indica* promotes adventitious root formation in cuttings. Scientia Hortic 112: 422-426.
- Dumas, C., Knox, R. (1983): Callose and determination of pistil viability and incompatibility. Theor Appl Genet 67: 1-10.
- European Union. (2004): Council Regulation No 2092/91/EEC of 24 June 1991 on organic production of agricultural products and indications referring thereto on agricultural products and foodstuffs.
<<http://europa.eu.int/scadplus/leg/en/lvb/l21118.htm>
- Ewald, A. (1996): Interspecific hybridization between *Cyclamen persicum* MILL. and *C. purpurascens* MILL. Plant Breeding 115: 162-166.
- Ewald, A., Lepper, L., Lippold, R., Schwenkel, H. G. (2000): Studien zur generativen Vermehrung von Arthybriden aus der Kreuzung *Cyclamen persicum* MILL. X *C. purpurascens* MILL. Gartenbauwissenschaft 65: 162-169.

- Fischer, P., Anneser, K. (2003): Cyclamen - Ernährungsstörungen und ihre Symptome. DEGA - Deutscher Gartenbau (2) S: 16-18.
- Fortescue, J. A., Turner, D. W. (2004): Pollen fertility in *Musa*: Viability in cultivars grown in Southern Australia. Australian Journal of Agricultural Research 55: 1085-1091.
- Fortescue, J. A., Turner, D. W. (2005): The occurrence of a micropylar exudate in *Musa* and *Enset* (Musaceae). Scientia Horticulturae 104: 445-461.
- Fu, X. L., Lu, Y. G., Liu, X. D., Li, J. Q., Feng, J. H. (2007): Cytological mechanisms of interspecific incrossability and hybrid sterility between *Oryza sativa* L. and *O. alta Swallen*. Chinese Science Bulletin 52: 755-765.
- Geerts, P., Toussaint, A., Mergeai, G., Baudoin, J. P. (2002): Stude of the early abortion in reciprocal crosses between *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus polyanthus* Greenm. Biotechnol Agron Soc Environ 6: 109-119.
- George, E., Marschner, H., Jakobsen, I. (1995): Role of arbuscular mycorrhizal fungi in uptake of phosphorus and nitrogen from soil. Critical Reviews in Biotechnology 1: 257-270.
- Golubovskaya, I. N. (1989): Meiosis in maize: meigenes and conception of genetic control of meiosis. Advances in Genetics 26: 149-192.
- Grey-Wilson, C. (1988): the Genus cyclamen (A kew Magazine Monograph).the Royal Botanic Gardens, kew in association with Christopher Helm and Timber Press. Kew Mag 3: 104-109.
- Grey-Wilson, C. (2002): Cyclamen (A guide for gardeners, horticulturists and botanists). B.T. Bastsford, England. pp. 224.
- Gründler, I. G. (1987): Das Alpenveilchen. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin, 17-19,33,87.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Von Tiedemann, A. (2007): Phytomedizin, Grundwissen Bachelor, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Hanke, M. (2008): Die deutsche Cyclamen-Produktion, erschienen in das Magazin für Zierpflanzenbau 12: S.14.
- Harrison, M. J. (2005): Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Annu Rev Microbiol 59: 19-42.

- Haselberg, C. V., Lüdders, P., Stösser, R. (2004): Pollen tube growth, fertilization and ovule longevity in the carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of Applied Botany-Angewandte Botanik* 78: 32-40.
- Hayman, D. S. (1983): The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis. *Canadian Journal of Botany* 61: 944-963.
- Heenan, P. B., Dawson, M. I., Bicknell, R. A. (2002): Evidence for apomictic seed formation in *Coprosma waima* (Rubiaceae). *Newzealand Journal of Botany* 40: 347-355.
- Herrero, M. (2001): Ovary signals for directional pollen tube growth. *Sex Plant Reprod* 14: 3-7.
- Ishizaka, H., Uematsu, J. (1990): Production of interspecific hybrids between *Cyclamen persicum* and *C. repandum* through ovule culture. *Japan J Breed* 40: 60-61.
- Ishizaka, H., Uematsu, J. (1992): Prodduction of interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* Mill. And *C. hederifolium* Ation by ovule culture: *Japan J Breed* 42: 353-366.
- Ishizaka, H., Uematsu, J. (1994): Amphidiploids between *Cyclamen persicum* Mill. and *C. herderifolium* Ation Induced through Colchicine Treatment of Ovules in Vitro and Plants. *Breeding Science* 44: 161-166.
- Ishizaka, H., Uematsu, J. (1995a): Interspecific hybrids of *cyclamen persicum* Mill. and *C. purpurascens* Mill. Produced by ovule culture. *Euphytica* 82 :31-37.
- Ishizaka, H., Uematsu, J. (1995b): Amphidiploids between *Cyclamen persicum* Mill. and *C. purpurascens* Mill. induced by treating ovules with colchicine in vitro and sesquidiploids between the amphidiploid and the parental species induced by conventional crosses. *Euphytica* 86: 211-218.
- Ishizaka, H. (1996): Interspecific hybrids of *cyclamen persicum* and *C. graecum*. *Euphytica* 91: 109-117.
- Ishizaka, H. (1998): Production of microspore-derived plants by anther culture of an interspecific F1 hybrid between *Cyclamen persicum* and *C. purpurascens*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 54: 21-28.
- Ishizaka, H. (2003): Cytogenetic studies in *cyclamen persicum*, *C. graecum* (Primulaceae) and their hybrids. *Plant Systematics and Evolution* 239: 1-14.
- Ishizaka, H. (2008): Interspecific hybridization by embryo rescue in the genus *Cyclamen*. *Plant Biotechnology* 25: 511-519.

- Issarakraisila, M., Considine, J. A. (1994): Effects of temperature on pollen viability in *Mango* cv. 'Kensington'. *Annals of Botany* 73: 231-40.
- Jeong, B. H., Saga, T., Okayasu, K., Hattori, G., Kaneko, Y., Bang, S. W. (2009): Production and characterization of an amphidiploid line between *Brassica rapa* and a wild relative *Diplotaxis tenuifolia*. *Plant Breeding* 128: 536-537.
- Johannsen, Wilhelm. (1909): *Elemente der exakten Erblchkeitslehre*. Jena.
- Johnston, A. E., Steén, I. (2000): *Understanding Phosphorus and its Use in Agriculture*, <<http://www.efma.org/index.asp>>
- Kaldorf, M., Koch, B., Rexer, K. H., Kost, G., Varma, A. (2005): Patterns of interaction between *Populus* Esch5 and *Piriformospor indica*: a transition from mutualism to antagonism. *Plant Biol* 7: 210-218.
- Kastner, U., Pank, F. (2006): Approaches for selection of sexual St. Johns' wort strains (*Hypericum perforatum* L.) for combination breeding. *Zeitschrift für Arznei- & Gewürzpflanzen* 11: 101-106.
- Kho, Y. O., Baër, J. (1968): Observing Pollen tubes by means of Fluorescence. *Euphytica* 17: 298-302.
- Kison, H. U., Franke, R. (1980): Zur Bestimmung der Lebensfähigkeit von Pollen. *Tag. Ber., Akad. Landwirtsch.-Wiss. DDR, Berlin* 171: 143-151.
- Knox, B., Williams, E., Dumas, C. (1986): Pollen, Pistil and Reproductive Function in Crop Plants. *Plant Breeding Rev* 4: 9-79.
- Kobayashi, N., Ogawa, K. (1994): Production of interspecific hybrids between *Cyclamen persicum* Mill. and *C. rohlfsianum* Aschers. or *C. libanoticum* Hildebr. by ovule culture. *Breeding Science* 44: 85.
- Koide, R. T. (1991): Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. *New Phytologist* 117: 365-386.
- Kolyasnikova, N. L. (1985): Determining the fertility of alfalfa by means of fluorescence microscopy. *Bot Issledovaniya na Uralae* 25.
- Kumar, M., Yadav, V., Tuteja, N., Johri, A. K. (2009): Antioxidant enzyme activities in maize plants colonized with *Piriformospora indica*. *Microbiology-SGM* 155: 780-790.
- Lau, T. C., Stephenson, A. G. (1994): Effects of Soil Phosphorus on Pollen Production, Pollen Size Pollen, Pollen Phosphorus-Content, and the Ability to Sire Seeds in *Cucurbita-Pepo* (*Cucurbitaceae*). *Sexual Plant Reproduktion* 7: 215-220.

- Lau, T. C., Lu, X., Koide, R.T., Stephenson, A. G. (1995): Effects of Soil Fertility and Mycorrhizal Infection on Pollen Production and Pollen Grain-Size of *Cucurbita-Pepo* (*Cucurbitaceae*). *Plant Cell and Environment* 18: 169-177.
- Lautenschläger, W., Kopp, G. (2000): Mikrowellen-Aufschlusstechnik für Fortgeschrittene Probenvorbereitung. *Labor-Praxis* – April 76-78.
- Legro, R. A. H. (1959): The cytological background of cyclamen breeding: *Meded Landbouwhogeschool Wageningen* 59: 1-59.
- Lekberg, Y., Koide, R. T. (2005): Is plant performance limited by abundance of arbuscular mycorrhizal fungi? A meta-analysis of studies published between 1988 and 2003. *New Phytologist* 168:189-204.
- Lewontin, R. (1992): Genotype and phenotype. In: E. Keller und E. Lloyd (Hg.), *Keywords in evolutionary biology*. Cambridge, MA. 137–144.
- Lewontin, R. (2008): The genotype/phenotype distinction. In: E. Zalta (Hg.). *The stanford encyclopedia of philosophy*. URL = <http://plato.stanford.edu/archives/fall2008/entries/genotype-phenotype/>.
- Li, X. L., Marschner, H., George, E. (1991): Acquisition of phosphorus and copper by VA-mycorrhizal hyphae and root-to-shoot transport in white clover. *Plant Soil* 136: 49-57.
- Li, X. F., Liu, S. B., Gao, J. R., Lu, W. H., Wang, H. G. (2005): Abnormal pollen development of bread wheat-Leymus mollis partial amphiploid. *Euphytica* 144: 247-253.
- Loughman, B. C., Kime, M. J., Ratcliffe, R. G., Willams, R. J. P. (1981): Phosphorus-31 NMR Studies on storage and Transport forms of phosphate. *Proceedings of the International Botanical Congress* 13: 259.
- Marr, D. L., Pellmyr, O. (2003): Effect of pollinator-inflicted ovule damage on floral abscission in the yucca-yucca moth mutualism: the role of mechanical and chemical factors. *Oecologia* 136: 236-243.
- Marschner, H. (1995): *Buch Mineral nutrition of Higher plants*. London Acaemic. pp. 889.
- Mascarenhas, J. P. (1989): The male gametophyte of flowering plants. *Plant Cell* 1: 657-664.
- Mazzucato, A., Olimpieri, I., Ciampolini, F., Cresti, M., Soressi, G.P., 2003: A defective pollen-pistil interaction contributes to hamper seed set in the parthenocarpic fruit tomato mutant. *Sexual Plant Reproduction* 16: 157-164.

- Mendel, G. (1866): Versuche über Pflanzenhybriden. In: Verhandlungen des naturforschenden Vereins in Brünn 4: 3-47.
- Mercado, J. A., Martrigo, M., Reid, M. S., Valpuesta, V., Quesada, M. A. (1997): Effects of low Temperature on *Pepper* Pollen morphology and fertility: Evidence of cold induced exine alterations. *Journal of Horticultural Science* 72: 317-326.
- Milan, P. R. (2008): Chromosome Behaviour and Fertility in Induced Polyploids of Grain Amaranths. *Caryologia* 61: 199-205.
- Moore, R. P. (1986): ISTA Handbuch für die Tetrazoliumuntersuchung, Zürich. pp. 118.
- Mutton, L., Patterson, B. D., Nguyen, V. O. (1987): Two stages of pollen development are particularly sensitive to low temperature. *TGC Report* 37: 56-7.
- Naether, J. (1971): Verfahren für die genetische Analyse der sporophytisch bedingten Selbstinkompatibilität auf diploider Stufe und ihre Anwendung in der Hybridzüchtung Dissertation, Akad., Landwirtsch.-Wiss., Berlin.
- Neumann, E., George, E. (2004): Colonisation with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol.& Gerd.) enhanced phosphorus uptake from dry soil in *Sorghum bicolor* (L.). *Plant and Soil* 261: 245-225.
- Nimura, M., Kato, J., Mii, M., Morioka, K. (2003): Unilateral compatibility and genotypic difference in crossability in interspecific hybridization between *Dianthus Caryophyllus* L. and *Dianthus japonicus* Thunb. *Theor Appl Genet* 106: 1164-1170.
- Nimura, M., Kato, J., Horaguchi, H., Mii, M., Sakai, K., Katoh, T. (2006): Induction of fertile amphidiploid induction by artificial chromosome-doubling in interspecific hybrid between *Dianthus caryophyllus* L. and *D. japonicus* Thunb. *Breeding Science* 56: 303-310.
- Odenbach, W. (1997): Biologische Grundlagen der Pflanzenzüchtung. Parey Buch Verlag, Berlin. pp. 381.
- Oelmüller, R., Sherameti, I., Tripathi, S., Varma, A. (2009): *Piriformospora indica*, a cultivable root endophyte with multiple biotechnological applications. *Symbiosis* 49: 1-17.
- Ortas, I., Akpinar, C. (2006): Response of kidney bean to arbuscular mycorrhizal inoculation and mycorrhizal dependency in P and Zn deficient soils. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant* 56: 101-109.

- Oryol, L. I., Kostantinova, L. N., Ogorodnikova, V. F., Dzyubenko, N. I. (1986): The fertility of lucerne ovules and methods for its evaluation. *Sbornik Nauchnykh Trudov po Prikladnoi Botanike, Genetika i Selekcii* 99: 10-17
- Peskan-Berghofer, T., Shahollari, B., Giong, P. H., Hehl, S., Markert, C., Blanke, V., Kost, G., Varma, A., Oelmüller, R. (2004): Association of *Piriformospora indica* with *Arabidopsis thaliana* roots represents a novel system to study beneficial plant-microbe interactions and involves early plant protein modifications in the endoplasmic reticulum and at the plasma membrane. *Physiologia Plantarum* 122: 465-477.
- Pham, G. H., Singh, A., Malla, R., Kumari, M., Prasad, R., Sachdev, M., Rexer, K. H., Kost, G., Luis, P., Kaldorf, M., Buscot, F., Herrmann, S., Peskan, T., Oelmüller, R., Saxena, A. K., Declerck, S., Mittag, M., Stabentheiner, E., Hehl, S., Varma, A. (2004): Interaction of *Piriformospora indica* with diverse microorganisms and plants. In Varma, A., Abbot, L., Werner, D., Hampp, R., (eds.), *Plant Surface Microbiology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 237-264.
- Phillips, J. M., Hayman, D. S. (1970): Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Brit Mycorrh Soc* 55: 158-162
- Poulton, J. L., Koide, R. T., Stephenson, A. G. (2001a): Effects of mycorrhizal infection and soil phosphorus availability on in vitro and in vivo pollen performance in *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae). *American Journal of Botany* 88: 1786-1793.
- Poulton, J. L., Koide, R. T., Stephenson, A. G. (2001b): Effects of mycorrhizal infection, soil phosphorus availability and fruit production on the male function in two cultivars of *Lycopersicon esculentum*. *Plant Cell and Environment* 24: 841-849.
- Poulton, J. L., Bryla, D., Koide, R. T., Stephenson, A. G. (2002): Mycorrhizal infection and high soil phosphorus improve vegetative growth and the female and male functions in tomato. *New Phytologist* 154: 255-264.
- Quesada, M., Winsor, J. A., Stephenson, A. G. (1996): Effects of pollen selection on progeny vigor in a *Cucurbita pepo* x *C. texana* hybrid. *Theoretical And Applied Genetics* 92: 885-890.
- Rai, M., Acharya, D., Singh, A. (2001): Positive growth responses of the medicinal plants *Spilanthes calva* and *Withania somnifera* to inoculation by *Piriformospora indica* in a field trial. *Mycorrhiza* 11: 123-128.

- Rai, M., Varma, A. (2005): Arbuscular mycorrhiza - like biotechnological potential of *Piriformospora indica*, which promotes the growth of *Adhatoda vasica* Nees. Electronic Journal of Biotechnology 8: 108-112.
- Reinhardt, S. (2006): Vergleichende morphologische-anatomische und physiologische Untersuchung zur Samenanlagenqualität von *Cyclamen persicum* Mill.- unter besonderer Berücksichtigung der Saatgutqualität. Dissertation, FSU Jena. pp. 118.
- Rosellini, D., Lorenzetti, F., Bingham, E. T. (1998): Quantitative ovule sterility in *Medicago sativa*. Theor Appl Genet 97: 1289-1295.
- Rosellini, D., Ferranti, F., Barone, P., Veronesi, F. (2003): Expression of female sterility in alfalfa (*Medicago sativa* L.). Sex Plant Reprod 16: 271-279.
- Röber, R., Schaller, K. (1985): Pflanzenernährung im Gartenbau, Handbuch des Erwerbsgärtners, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart. pp. 352.
- Satake, T., Hayase, H. (1970): Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. V. Estimation of Pollen developmental stage and the most sensitive stage of coolness. Proceedings of the Crop Science Society of Japan 39: 468-73.
- Scagel, C. F. Linderman, R. G. (1998): Relationships between differential *in vitro* indole-acetic acid or ethylene production capacity by ectomycorrhizal fungi and conifer seedling responses in symbiosis. Symbiosis 24: 13-34.
- Schilling, G. (2000): Pflanzenernährung und Düngung, UTB, Stuttgart.
- Schäfer, P., Pfiffi, S., Voll, L. M., Zajic, D., Chandler, P. M., Waller, F., Scholz, U., Pons-Kühnemann, J., Sonnewald, S., Sonnewald, U., Kogel, K. H. (2009): Manipulation of plant innate immunity and gibberellin as factor of compatibility in the mutualistic association of barley roots with *Piriformospora indica*. erschienen in The Plant Journal 59: 461-474.
- Serfling, A., Wirsal, S. G. R., Lind, V., Deising, H. B. (2007): Performance of the biocontrol fungus *Piriformospora indica* on wheat under greenhouse and field conditions. Phytopathology 97: 523-531
- Shahollari, B., Varma, A., Oelmüller, R. (2005): Expression of a receptor kinase in Arabidodspis roots is stimulated by the basidiomycete *Piriformospora indica* and the protein accumulates in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains. Journal of Plant Physiology 162: 945-958.

- Shahollari, B., Vadassery, J., Varma, A. (2007): A leucine-rich repeat protein is required for growth promotion and enhanced seed production mediated by the endophytic fungus *Piriformospora indica* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 50: 1-13.
- Sharma, M., Schmid, M., Rothballer, M., Hause, G., Zuccaro, A., Imani, J., Kampfer, P., Domann Schafer, P., Hartmann, A., Kogel, K. H. (2008): Detection and identification of bacteria intimately associated with fungi of the order *Sebacinales*. *Cellular Microbiology* 10: 2235-2246.
- Shen, H., Chen, J., Wang, Z., Yang, C., Sasaki, T., Yamamoto, Y., Matsumoto, H., Yan, X. (2006): Root plasma membrane H⁺-ATPase is involved in the adaptation of soybean to phosphorus starvation. *Journal of Experimental Botany* 57: 1353-1362.
- Sherameti, I., Venus, Y., Drzewiecki, C., Tripathi, S., Dan, V. M., Nitz, I., Varma, A., Grundler, F. M., Oelmüller, R. (2008): PYK10, a betaglucosidase located in the endoplasmatic reticulum, is crucial for the beneficial interaction between *Arabidopsis thaliana* and the endophytic fungus *Piriformospora indica*. *Plant Journal* 54: 428-439.
- Singh, A., Sharma, J., Rexer, K.H., Varma, A. (2000). Plant productivity determinants beyond minerals, water and light: *Piriformospora indica*: A revolutionary plant growth promoting fungus. *Current Science* 79: 1548-1554.
- Singh, R. J 2003: Plant cytogenetics. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL. Pages: xv + 463 pp
- Sirrenberg, A., Goebel, C., Grond, S., Czempinski, N., Ratzinger, A., Karlovsky, P., Santos, P., Feussner, I., Pawlowski, K. (2007): *Piriformospora indica* affects plant growth by auxin production. *Physiologia Plantarum* 131: 581-589.
- Sliwinska, E., Jing, H. C., Job, C., Job, D., Bergervoet, J. H. W., Bino, R. J., Groot, S. P. C. (1999): Effect of harvest time and soaking treatment on cell cycle activity in sugarbeet seeds. *Seed Science Research* 9: 91-99.
- Sliwinska, E. (2000): Analysis of the Cell Cycle in Sugarbeet Seed during Development, Maturation and Germination. In: Black, M., Bradford, K., Vazquez-Ramos, J. (eds) *Seed Biology, Advances and Applications*, Proceedings of the Sixth International Workshop on Seeds, Merida, Mexico, 1999, CABI Publishing.
- Sliwinska, E. (2009): Nuclear DNA replication and seed quality. *Seed Science Research* 19: 15-25.

- Smith, S. E., Gianinazzi-Pearson, V. (1988): Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol* 39: 221-244.
- Song, J. J., Nada, K., Tachibana, S. (2002): Suppression of S-adenosylmethionine decarboxylase activity is a major cause for high-temperature inhibition of pollen germination and tube growth in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant And Cell Physiology* 43: 619-627.
- Souza, M. M., Pereira, T. N. S., Viana, A. P., Pereira, M.G., Bernacci, L. C., Sudre, C. P., Silva, L. D. C. (2003): Meiotic irregularities and Pollen viability in *Passiflora edmundoi* Sacco (*Passifloraceae*). *Caryologia* 56:161-169.
- StatSoft, Inc. (2004): STATISTICA für Windows [Software-System für Datenanalyse] Version 6. www.statsoft.com.
- Steer, M. W., Steer, J. M. (1989): Pollen tube tip growth. *New Phytol* 111: 323-358.
- Stein, E., Molitor, A., Kogel, K. H., Waller, F. (2008): Systemic resistance in *Arabidopsis* conferred by the mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* requires jasmonic acid signaling and the cytoplasmic function of NPR1. *Plant Cell Physiol* 49: 1747-1751.
- Stubbe, H. (1965): Kurze Geschichte der Genetik bis zur Wiederentdeckung der Vererbungsregeln Gregor Mendels. Steif brosch. 2. überarbeitete und ergänzte Auflage. Beitrag 1 in: Genetik. Grundlagen, Ergebnisse und Probleme in Einzeldarstellungen. (Herausgeber H. Stubbe.) VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. 42 Abb. XIV + 272 S.
- Sutton, W. S. (1903): The chromosomes in heredity *Biol Bull* 4:231-251.
- Tang, Y., Lv, S. X., Wang, G. X. Zhao, H., Sheng, X. G., Liu, F. (2009): Asynchronous meiotic and chromosomal abnormalities in pollen mother cells of cauliflower-black mustard somatic hybrids. *Genomics and Applied Biology* 28: 1111-1116.
- Teng, N., Chen, T., Jin, B., Wu, X., Huang, Z., Li, X., Wang, Y., Mu, X., Lin, J. (2006): Abnormalities in pistil development result in low seed set in *Leymus chinensis* (Poaceae). *Flora- Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plant* 201: 658-667.
- Vadassery, J., Ritter, C., Venus, Y., Camehl, I., Varma, A., Shahollari, B., Novak, O., Strnad, M., Ludwig-Muller, J., Oelmüller, R. (2008): The role of auxins and cytokinins in the mutualistic interaction between *Arabidopsis* and *Piriformospora indica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 1371-1383.

- Varma, A., Verma, S., Sudah, Sahay, N., Franken, P. (1999): *Piriformospora indica*, a cultivable plant growth-promoting root endophyte. *Applied & Environmental Microbiology* 65: 2741-2744.
- Verma, S., Varma, A., Rexer, K. H., Hassel, A., Kost, G., Sarbhoy, A., Bisen, P., Bütehorn, B., Franken, P. (1998): *Piriformospora indica*, gen. nov. sp. nov., a new root-colonizing fungus. *Mycologia* 90: 896-903.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Hückelhoven, R., Neumann, C., von Wettstein, D., Franken, P., Kogel, K. H. (2005): The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 13386-13391.
- Watson, J. D., Crick, F. H. (1953): Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171: 737-8.
- Weiss, M., Selosse, M. A., Rexer, K. H., Urban, A., Oberwinkler, F. (2004): Sebaciniales: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. *Mycol Res* 108: 1003-1010.
- Zerche, S., Druge, U., Kadner, R. (2008): Nitrogen absorption, growth of stock plants, and adventitious rooting of *Pelargonium x hortorum* cuttings as affected by the form and dosage of nitrogen. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 83: 207-217.
- Zhao, H., Bughrara, S. S., Wang, Y. (2007): Cytology and Pollen grain fertility in creeping bentgrass interspecific and intergeneric hybrids. *Euphytica* 156: 227-235.
- Zhao, X. F., Sun, W. B. (2009): Abnormalities in sexual development and pollinator limitation in *Michelia coriacea* (Magnoliaceae), a critically endangered endemic to Southeast Yunnan, China. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 204: 463-470.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Eckhard George für die Überlassung des Themas und die Freiheit bei dessen Bearbeitung sowie für die fachliche Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Aloma Ewald für die kompetente Betreuung zur vorliegenden Arbeit, das Interesse, die wertvollen Hinweise bei den Experimenten, Hinweise zum sprachlichen, fachlichen und methodischen Ansatz der Arbeit und zuletzt für die freundliche Betreuung.

Ebenso gilt mein Dank:

- Herrn Dr. Siegfried Zerche für die Beratung und Hilfe bei der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse und Phosphatuntersuchung
- Herrn Dr. Frank Hennig für zahlreiche Ratschläge, Hinweise und seine Unterstützung des Manuskripts
- Herrn Wolfgang Köhnke für seine Hilfe bei der Vorbereitung (*Piriformospora indica*)
- Frau Sabine Kalkofe für die technische Assistenz bei der Durchführung der Experimente

Weiterhin möchte ich ganz herzlich danken:

- Den Gärtnern im Institut, die meine Pflanzen liebevoll pflegten
- Allen hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern des IGZ, die durch ihre Kollegialität einen großen Anteil am Zustandekommen dieser Arbeit hatten

Zuletzt gilt der Dank meiner Familie (Eltern, Brüder, Schwester, Frau, und Kindern), die mir aufopferungsvoll alle nötigen Freiheiten einräumten und damit zum Gelingen dieser Arbeit viel beitrugen. Zudem möchte ich nicht alle meine Freunde vergessen und besonders Dr. Ahmad Mouhanna, Dr. Waad Ibrahim und Dr. Ali Abboud für ihre Hilfe danken.

Außerdem möchte ich mich bei dem Hochschulministerium der arabischen syrischen Republik und dem Ministerium für Landwirtschaft der Bundesrepublik Deutschland, dem

Land Brandenburg und dem Freistaat Thüringen für die finanzielle Unterstützung bedanken.